

## 日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

02.11.99

4  
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

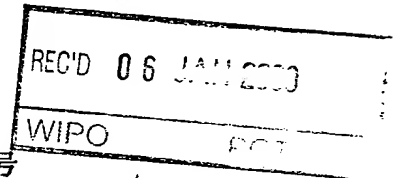
1998年11月4日

出願番号  
Application Number:

平成10年特許願第313366号

出願人  
Applicant(s):

株式会社中外分子医学研究所



JP99/6111

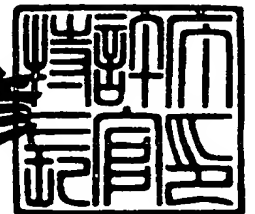
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年12月10日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特平11-3085301

【書類名】 特許願

【整理番号】 C2-006

【提出日】 平成10年11月 4日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/12

【発明の名称】 新規トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ

【請求項の数】 23

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

    【氏名】 妹尾 千明

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

    【氏名】 沼田 真理子

【特許出願人】

    【識別番号】 596102791

    【氏名又は名称】 株式会社中外分子医学研究所

    【代表者】 大杉 義征

【代理人】

    【識別番号】 100102978

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

    【識別番号】 100108774

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9716403

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【請求項 2】 配列番号：4 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：4 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【請求項 3】 配列番号：6 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：6 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【請求項 4】 配列番号：8 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：8 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【請求項 5】 配列番号：10 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：10 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【請求項 6】 配列番号：1 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリノ



ズするDNAがコードするタンパク質であって、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【請求項7】 配列番号：3に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【請求項8】 配列番号：5に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、配列番号：6に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【請求項9】 配列番号：7に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、配列番号：8に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【請求項10】 配列番号：9に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、配列番号：10に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【請求項11】 請求項1～10のいずれかに記載のタンパク質の部分ペプチド。

【請求項12】 請求項1～10のいずれかに記載のタンパク質と他のペプチドとからなる融合タンパク質。

【請求項13】 請求項1～12のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA。

【請求項14】 請求項13に記載のDNAが挿入されたベクター。

【請求項15】 請求項13に記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体。

【請求項16】 請求項15に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項1～10のいずれかに記載のタンパク質の製造方法。

【請求項17】 請求項1～10のいずれかに記載のタンパク質の基質をスクリーニングする方法であって、

(a) 該タンパク質に被検試料を接触させる工程、

(b) 該タンパク質の被検試料に対するプロテアーゼ活性を検出する工程、および

び

(c) 該プロテアーゼ活性により分解または切断を受ける化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項 18】 請求項 17 に記載の方法により単離されうる、請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載のタンパク質の基質。

【請求項 19】 請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載のタンパク質の活性を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料の存在下で該タンパク質に請求項 18 に記載の基質を接触させる工程、

(b) 該タンパク質による該基質に対するプロテアーゼ活性を検出する工程、および

(c) 被検試料非存在下において検出した場合と比較して、該プロテアーゼ活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項 20】 請求項 19 に記載の方法により単離されうる、請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載のタンパク質の活性を阻害する化合物。

【請求項 21】 請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載のタンパク質に結合する抗体。

【請求項 22】 請求項 21 に記載の抗体と、請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載のタンパク質が含まれると予想される試料とを接触させ、該抗体と該タンパク質との免疫複合体の生成を検出又は測定することを含んでなる、該タンパク質を検出又は測定する方法。

【請求項 23】 配列番号：1、3、5、7 または 9 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA と特異的にハイブリダイズし、少なくとも 15 塩基の鎖長を有する DNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は新規トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ、その遺伝子、並びにそれらの製造及び用途に関する。

【0002】

【従来の技術】

雄性配偶子である精子は、雄の生殖器官である精巣において、主に（１）生殖幹細胞である精原細胞の自己増殖と精子への分化の開始、（２）精母細胞の減数分裂と遺伝子の組み換え、（３）半数体精子細胞の精子への形態形成、の３段階の過程を経て生産される。こうして形成された精子は交尾により雌体に排出され、卵管を通過し、雌性配偶子である卵子と結合し受精に至る（K. Yomogidaおよび Y. Nishimune (1998) 蛋白質核酸酵素, 511-521）。

【0003】

受精において、精子は卵管を通り卵子表面の透明帯と結合し、その透明帯を通過し、さらに卵子と融合する必要がある。これら受精の過程にはさまざまなプロテアーゼが関与している。例えば精子型アンジオテンシン変換酵素（testis ACE）は、そのノックアウトマウスの解析（J.H. Kregeら(1995) Nature 375, 146-148; C.R. Esther Jrら (1996) Lab. Invest. 74, 953-965）から、精子が卵管を通る際に重要な役割を果たしていることが示されており（J.R. Hagamanら, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 2552-2557）、また、前駆体タンパク質変換酵素4（PC4）も、雄のノックアウトマウスでは受精が著しく低下する（M. Mbikayら (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 6842-6846）。

【0004】

セリンプロテアーゼに関しては、in vitroの受精が各種のトリプシンインヒビターにより阻害されることから、精子が透明帯を通過する際、精子（特に先端）に含まれるトリプシン様セリンプロテアーゼが透明帯を消化することが示唆されている（P.M. Saling (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6231-6235; D.A. Benauおよび B.T. Storey (1987) Biol. Reprod. 36, 282-292; D.Y. Liuおよび H.W. Baker (1993) Biol. Reprod. 48, 340-348）。従来は精子先端に存在するトリプシンファミリーセリンプロテアーゼであるアクロシン（acrosin）がこの働きを担っていると考えられていた（C.R. Brown (1983) J. Reprod. Fertil. 69, 289-295; H. Kremlingら (1991) Genomics 11, 828-834; U. Klemmら (1990) Differentiation 42, 160-166）。しかしそのノックアウトマウスがほ

な受精をすることが判明し、アクロシン以外の精子に存在するセリンプロテアーゼが透明帯の消化を行っていることが示唆されている (T. Babaら (1994) J. Biol. Chem. 269, 31845-31849; I.M. Adhamら (1997) Mol. Reprod. Dev. 46, 370-376)。ホヤではスperlモシン (spermosin) というトリプシンファミリーセリンプロテアーゼが精子で発現しており (H. Sawadaら (1984) J. Biol. Chem. 259, 2900-2904)、この特異抗体がホヤの受精を濃度依存的に阻害することが判明している (H. Sawadaら (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 222, 499-504)。また、最近マウスの精子先端に特異的に発現しているトリプシンファミリーセリンプロテアーゼであるTESP1、TESP2のcDNAがクローニングされた (N. Kohnoら (1998) Biochem. Biophys. Res. Commun. 245, 658-665)。しかし、この遺伝子が有する受精の際の役割はいまだ判明していない。これまでに透明帯を消化する働きを持つ、精子に存在するセリンプロテアーゼは報告されていない。

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、精子の形成や機能に関連する新規トリプシンファミリーセリンプロテアーゼおよびそれらをコードする遺伝子、並びにそれらの製造方法および用途を提供することを課題とする。

#### 【0006】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、76A5sc2と命名された遺伝子のポリメラーゼ連鎖反応による増幅の結果、76A5sc2遺伝子とは異なる配列を有する遺伝子断片を見出した。本発明者らは、この遺伝子断片を基に、成体マウス精巣に特異的に発現する2つの新規トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ(「Tesppec PR0-1」及び「Tesppec PR0-2」)の全オープンリーディングフレーム(ORF)を含むcDNAをクローニングし、さらにこれら遺伝子の組織における発現について解析した。

#### 【0007】

単離された「Tesppec PR0-1」(Testis specific expressed serine proteinase -1)は321アミノ酸をコードすると予想され、その予想アミノ酸配列はトリプシンファミリーセリンプロテアーゼモチーフである「Trypsin-His」および「Try

psin-Ser」活性部位を有し、また他のトリプシンファミリーセリンプロテアーゼであるアクロシンやプロスタシン、トリプシンなどと、この2つのモチーフおよびその近傍において非常に高い相同性を示した。しかし、それ以外の領域においては核酸およびアミノ酸レベルで高い相同性を示す既知遺伝子は存在せず、新規なトリプシンファミリーセリンプロテアーゼであることが判明した。

## 【0008】

一方、「Tspec PRO-2」は319アミノ酸をコードすると予想され、「Trypsin-His」活性部位を保持していた。「Trypsin-Ser」活性部位については12アミノ酸よりなるモチーフ中、2アミノ酸がモチーフとは異なるが、他の既知トリプシンファミリーセリンプロテアーゼにおいてもこのような例は存在するため、「Tspec PRO-2」はプロテアーゼとして機能すると考えられる。「Tspec PRO-2」もまた、核酸およびアミノ酸レベルで高い相同性を示す既知遺伝子は存在せず、新規なトリプシンファミリーセリンプロテアーゼであることが判明した。

## 【0009】

「Tspec PRO-2」には、興味深いことに「Tspec PRO-2」の前半領域と「Tspec PRO-1」の後半領域がつながったスプライシングアイソフォームが存在した。このため、これら2つのプロテアーゼは染色体上で非常に近い位置に存在することが示唆された。「Tspec PRO-2」には種々のスプライシングアイソフォームが存在するが、「Tspec PRO-2」以外のアイソフォームは長いORFが開かず、プロテアーゼをコードしていなかった。「Tspec PRO-1」および「Tspec PRO-2」は核酸レベル、アミノ酸レベルでそれぞれ52.2%、33.1%の相同性を有していた。

## 【0010】

本発明者らは、また、マウス「Tspec PRO-2」の核酸配列を基に、RT-PCR及びRACEを用いて、ヒト「Tspec PRO-2」のcDNAのクローニングを行った。これにより取得されたヒト「Tspec PRO-2」とマウス「Tspec PRO-2」は核酸レベル、アミノ酸レベルでそれぞれ74.2%、69.8%の相同性を有することが判明した。また、ヒト「Tspec PRO-2」は第8染色体にコードされていることが判明した。

## 【0011】

本発明者らはさらに、マウス「Tspec PRO-1」の核酸配列を基に、RT-PCR及び

RACEを用いて、ヒト「Tespec PRO-3」のcDNAのクローニングに成功した。また、ヒト「Tespec PRO-3」のカウンターパートであるマウス「Tespec PRO-3」のcDNAのクローニングにも成功した。

【0012】

「Tespec PRO-1」をコードする領域をプローブとしたマウスノーザンブロットの解析より、この遺伝子は成体マウス精巣でのみ発現が見られ、他の組織や胎児期ではその発現は確認されなかった。同様にRT-PCRによる解析からも、「Tespec PRO-1」の発現は成体精巣で非常に高いことが判明した。また、「Tespec PRO-1」は生後18日目以降の精巣で発現の上昇が確認できたが、生後12日目以前の精巣や精子形成不全の変異体マウス精巣ではその発現が全く見られなかった。同様な解析を「Tespec PRO-2」でも行ったところ、「Tespec PRO-1」と同様の発現パターンであることが判明した。これら事実は「Tespec PRO-1」及び「Tespec PRO-2」が、精子の分化・熟成または精子の機能（受精）に関与していることを示唆する。一方、トリプシンファミリーセリンプロテアーゼに関しては、受精の際に重要な役割を担っていることが示唆されている。

【0013】

従って、本発明者らは、見出した遺伝子によりコードされるタンパク質が、受精の鍵となるセリンプロテアーゼである可能性があり、新しい不妊症の治療薬や不妊症診断薬の開発、あるいは新しい避妊薬の開発に有用であると考えた。

【0014】

本発明は、精子の形成や機能に関連すると考えられる新規トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ、それらをコードする遺伝子、並びにそれらの製造方法および用途に関し、より具体的には、

(1) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質、

(2) 配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または該タン

パク質中のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質、

(3) 配列番号：6に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：6に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質、

(4) 配列番号：8に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：8に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質、

(5) 配列番号：10に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：10に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質、

(6) 配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質、

(7) 配列番号：3に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質、

(8) 配列番号：5に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、配列番号：6に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質、

(9) 配列番号：7に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAが

コードするタンパク質であって、配列番号：8に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質、

(10) 配列番号：9に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、配列番号：10に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質、

(11) (1)～(10)のいずれかに記載のタンパク質の部分ペプチド、

(12) (1)～(10)のいずれかに記載のタンパク質と他のペプチドとからなる融合タンパク質、

(13) (1)～(12)のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA、

(14) (13)に記載のDNAが挿入されたベクター、

(15) (13)に記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体、

(16) (15)に記載の形質転換体を培養する工程を含む、(1)～(10)のいずれかに記載のタンパク質の製造方法、

(17) (1)～(10)のいずれかに記載のタンパク質の基質をスクリーニングする方法であって、

(a) 該タンパク質に被検試料を接触させる工程、および

(b) 該タンパク質の被検試料に対するプロテアーゼ活性を検出する工程、および

(c) 該プロテアーゼ活性により分解または切断を受ける化合物を選択する工程、を含む方法、

(18) (17)に記載の方法により単離されうる、(1)～(10)のいずれかに記載のタンパク質の基質、

(19) (1)～(10)のいずれかに記載のタンパク質の活性を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料の存在下で該タンパク質に(18)に記載の基質を接触させる工程、

(b) 該タンパク質による該基質に対するプロテアーゼ活性を検出する工程、および

(c) 被検試料非存在下において検出した場合と比較して、該プロテアーゼ活性



を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(20) (19)に記載の方法により単離されうる、(1)～(10)のいずれかに記載のタンパク質の活性を阻害する化合物、

(21) (1)～(10)のいずれかに記載のタンパク質に結合する抗体、

(22) (21)に記載の抗体と、(1)～(10)のいずれかに記載のタンパク質が含まれると予想される試料とを接触させ、該抗体と該タンパク質との免疫複合体の生成を検出又は測定することを含んでなる、該タンパク質を検出又は測定する方法、

(23) 配列番号：1、3、5、7または9のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するDNA、に関する。

【0015】

【発明の実施の形態】

本発明は、新規トリプシンファミリーセリンプロテアーゼに関する。本発明のタンパク質に含まれる「Tespac PRO-1」と命名されたマウスタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：2に、「Tespac PRO-2」と命名されたマウスおよびヒトタンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：4および6に、また「Tespac PRO-3」と命名されたマウスおよびヒトタンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：8および10に示し、それらのタンパク質をコードするcDNAの塩基配列をそれぞれ配列番号：1、3、5、7および9に示す。

【0016】

本発明のタンパク質に含まれる「Tespac PRO-1」及び「Tespac PRO-2」は、マウス精巣において高い発現が観察された（実施例5および6）。これらのタンパク質は精子、特にその先端領域に存在するならば、精子が透明帯を消化し受精を成立させる際の鍵となるプロテアーゼである可能性がある。従って、本発明のタンパク質は、不妊症治療薬や不妊症診断薬あるいは避妊薬の開発に有用であると考えられる。

【0017】

また、本発明のタンパク質にはマウス「Tespac PRO-1」タンパク質、マウス「

Tespec PRO-2」タンパク質、ヒト「Tespec PRO-2」タンパク質、マウス「Tespec PRO-3」タンパク質、またはヒト「Tespec PRO-3」タンパク質と機能的に同等なタンパク質を包含する。ここで「機能的に同等」とは、マウス「Tespec PRO-1」タンパク質、マウス「Tespec PRO-2」タンパク質、ヒト「Tespec PRO-2」タンパク質、マウス「Tespec PRO-3」タンパク質、またはヒト「Tespec PRO-3」タンパク質と同等の生物学的特性を有していることを意味する。生物学的特性としては、例えば、①活性の特性として、トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ活性を有すること、②配列の構造的特性として、トリプシンファミリーセリンプロテアーゼモチーフ（「Trypsin-His (PROSITE PS00134)」、「Trypsin-Ser (PROSITE PS00135)」）および／またはそれと類似した配列を有することや、マウス「Tespec PRO-1」タンパク質、マウス「Tespec PRO-2」タンパク質、ヒト「Tespec PRO-2」タンパク質、マウス「Tespec PRO-3」タンパク質、もしくはヒト「Tespec PRO-3」タンパク質のアミノ酸配列と高い相同性が見られること（後述）、③発現特性として、精巢に発現すること、などが挙げられる。

## 【0018】

このようなタンパク質を得るための方法としては、例えば、タンパク質のアミノ酸配列に変異を導入する方法が用いられている。アミノ酸配列に変異が導入されたタンパク質を得るためには、例えば、合成オリゴヌクレオチドプライマーを利用した部位特異的変異誘発法 (Kramer, W. and Fritz, H. J. *Methods in Enzymol.* (1987) 154, 350-367) やPCRによる部位特異的変異誘発システム (GIBCO-BRL社)、Kunkel法 (*Methods Enzymol.* 85, 2763-2766 (1988)) を使用することができる。これらの方法により、配列番号：2、4、6、8または10に示されたアミノ酸配列からなるタンパク質において、その生物学的特性に影響を与えないよう、1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加、挿入及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたタンパク質を得ることができる。

## 【0019】

変異するアミノ酸の個数は、配列番号：2、4、6、8または10に示されたアミノ酸配列からなるタンパク質の生物学的特性を保持しうる限り特に制限はない。配列番号：2、4、6、8または10のいずれかに示されるアミノ酸配列中

の1又は2個以上、好ましくは、2個以上30個以下、より好ましくは2個以上10個以下のアミノ酸が欠失したものの、配列番号：2、4、6、8または10のいずれかに示されるアミノ酸配列に1又は2個以上、好ましくは、2個以上30個以下、より好ましくは2個以上10個以下のアミノ酸が付加したものの、配列番号：2、4、6、8または10のいずれかに示されるアミノ酸配列中の1又は2個以上、好ましくは、2個以上30個以下、より好ましくは2個以上10個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたものが挙げられる。また、アミノ酸の変異部位も、配列番号：2、4、6、8または10に示されたアミノ酸配列からなるタンパク質の生物学的特性を保持しうる限り特に制限はない。

#### 【0020】

あるアミノ酸配列に対する1または複数個のアミノ酸残基の欠失、付加および/または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するタンパク質がその生物学的活性を維持することはすでに知られている (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。

#### 【0021】

例えば、本発明のタンパク質に1または複数個のアミノ酸残基が付加されたタンパク質として、融合タンパク質が挙げられる。融合タンパク質は、本発明のタンパク質と他のペプチドとが融合したものである。融合タンパク質は人為的に作製することもできる。例えば、本発明のタンパク質をコードするDNAと他のペプチドをコードするDNAをフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよく、すでに公知の手法を用いることができる。本発明のタンパク質との融合に付される他のペプチドとしては、特に限定されない。例えば、ペプチドとしては、FLAG (Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210)、6個のHis (ヒスチジン) 残基からなる6×His、10×His、インフルエンザ凝集素 (HA)、ヒトc-mycの断片、VSV-GPの断片、p18HIVの断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T抗原の断片、lck tag、 $\alpha$ -tubulinの断片、B-

tag、Protein Cの断片等、すでに公知であるペプチドが使用される。またタンパク質としては、例えばGST（グルタチオン・S・トランスフェラーゼ）、HA（インフルエンザ凝集素）、イムノグロブリン定常領域、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、MBP（マルトース結合タンパク質）等が挙げられる。市販されているこれらをコードするDNAを融合させたものを用いることができる。

## 【0022】

また、当業者にとっては、周知技術であるハイブリダイゼーション技術（Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed. 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989）を用いて、上記本発明のタンパク質をコードするDNA（配列番号：1、3、5、7または9に記載のDNA）またはその一部を基に、これと相同性の高いDNAを単離して、該DNAから上記本発明のタンパク質と機能的に同等なタンパク質を得ることも当業者が通常行い得ることである。本発明のタンパク質には、ストリンジェントな条件下で上記本発明のタンパク質をコードするDNAまたはその一部とハイブリダイズするDNAがコードし、上記本発明のタンパク質と機能的に同等なタンパク質が含まれる。ハイブリダイズするDNAを他の生物から単離する場合、生物種に制限はないが、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウシ、サル、ブタなどを挙げることができる。「ストリンジェントな条件」とは、通常、「42℃、2xSSC、0.1% SDS」程度であり、好ましくは「50℃、2xSSC、0.1% SDS」程度であり、さらに好ましくは「65℃、2xSSC、0.1% SDS」程度である。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有するDNAを得ることができる。

## 【0023】

ハイブリダイズ技術により得られたDNAがコードするタンパク質は、通常、配列番号：2、4、6、8または10に記載のアミノ酸配列と高い相同性を有する。「高い相同性」とは、少なくとも60%以上の相同性、好ましくは70%以上の相同性、さらに好ましくは80%以上の相同性、さらに好ましくは95%以上の相同性を指す。タンパク質の相同性を決定するには、文献（Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730）に記載のアルゴリズムにしたがえばよい。

## 【0024】

本発明のタンパク質は、該タンパク質を産生する細胞や宿主あるいは精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点又は糖鎖の有無や形態が異なってもよい。得られたタンパク質が配列番号：2、4、6、8または10に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質の生物学的特性を保持している限り、本発明のタンパク質に含まれる。

【0025】

本発明のタンパク質は、天然のタンパク質として、また遺伝子組換え技術を利用して組み換えタンパク質として製造することが可能である。天然のタンパク質は、本発明のタンパク質が存在すると考えられる組織若しくは細胞（例えば精巢）からタンパク質を抽出し、後述する本発明の抗体を利用したアフィニティークロマトグラフィーを行うことにより調製することができる。

【0026】

また、組み換えタンパク質を製造するには、本発明のタンパク質をコードするDNAを発現制御領域、例えばエンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現可能なように発現ベクターに組み込み、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、タンパク質を発現させることができる。

【0027】

具体的には、例えば、哺乳類細胞を使用する場合、常用される有用なプロモーター／エンハンサー、本発明のタンパク質をコードするDNA、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させたDNAあるいはそれを含むベクターを構築することができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウイルス前期プロモーター／エンハンサー（human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer）を挙げることができる。

【0028】

また、その他にタンパク質発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、シミアンウイルス40（SV40）等のウイルスプロモーター／エンハンサーやヒトエロンゲーションファクター-1 $\alpha$ （HEF1 $\alpha$ ）の哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサー等を用いることができる。

【0029】

例えば、SV40プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法 (Nature (1979) 277, 108)、また、HEF1 $\alpha$ プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushimaらの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

【0030】

複製開始点としては、SV40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシバビローマウイルス (BPV) 等の由来のものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

【0031】

大腸菌を使用する場合、常用される有用なプロモーター、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列、発現させる遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法 (Nature (1998) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

【0032】

タンパク質分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。

【0033】

本発明のタンパク質を製造するための発現ベクターは、本発明に好適に使用される発現ベクターであればいかなる発現ベクターであってよい。本発明の発現ベクターとしては、例えば、アデノウイルスベクター「pAdexLcw」やレトロウイルスベクター「pZIPneo」などが挙げられる。また哺乳動物由来の発現ベクター、

例えばpEF、pCDM8、昆虫細胞由来の発現ベクター、例えばpBacPAK8、植物由来の発現ベクター、例えばpMH1、pMH2、動物ウイルス由来の発現ベクター、例えばpH SV、pMV、pAdexLcw、レトロウイルス由来の発現ベクター。例えばpZIpneo、酵母由来の発現ベクター、例えばpNV11、SP-Q01、枯草菌由来の発現ベクター、例えばpPL608、pKTH50、大腸菌由来の発現ベクター、例えばpQE、pGEAPP、pGEMEAPP、pMALp2、pREP4が挙げられる。

#### 【0034】

本発明において、タンパク質の製造のために、任意の産生系を使用することができる。タンパク質製造のための産生系は、*in vitro*および*in vivo*の産生系がある。*in vitro*の産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

#### 【0035】

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えばCHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)、あるいは昆虫細胞、例えばsf9、sf21、Tn5が知られている。CHO細胞としては、特にDHFR遺伝子を欠損したCHO細胞であるdhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) やCHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。

#### 【0036】

植物細胞としては、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えばサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えばアスペルギルス属 (*Aspergillus*) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) が知られている。

#### 【0037】

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌が知られている。

## 【0038】

これらの細胞を目的とするDNAにより形質転換し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することによりタンパク質が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。真核細胞であれば例えば、培養液として DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時の pH は約 6~8 であるのが好ましい。培養は通常約 30~40℃ で約 15~200 時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

## 【0039】

一方、*in vivo* の産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的とする DNA を導入し、動物又は植物の体内でタンパク質を産生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

## 【0040】

動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。例えば、目的とする DNA をヤギ  $\beta$  カゼインのような乳汁中に固有に産生されるタンパク質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。この DNA が挿入された融合遺伝子を含む DNA 断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受精したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁からタンパク質を得る。トランスジェニックヤギから産生されるタンパク質を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

## 【0041】

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的とする DNA を挿入したバキュロウイルスをカイコに感染させ、このカイコの体液より所望のタンパク質を得る (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315



, 592-594)。

【0042】

さらに植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とするDNAを植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えばニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望のポリペプチドを得る (Julian, K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

【0043】

上記で得られた本発明のタンパク質は、細胞内外、宿主から単離し実質的に純粋で均一なタンパク質として精製することができる。タンパク質の分離、精製は、通常のタンパク質の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせればタンパク質を分離、精製することができる。

【0044】

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。本発明は、これらの精製方法を用い、高度に精製されたタンパク質も包含する。

【0045】

なお、タンパク質を精製前又は精製後に適当なタンパク修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり部分的にペプチドを除去することもできる。

タンパク修飾酵素としては、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼが用いられる。

【0046】

本発明は、また、本発明のタンパク質の部分ペプチドも含む。このようなペプチドは、例えば、本発明のタンパク質に結合する抗体を得るための免疫原として利用しうる。この場合、ペプチドは、少なくとも12アミノ酸以上の鎖長を有し、好ましくは、20アミノ酸以上の鎖長を有する。本発明のタンパク質の部分ペプチドは、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明のタンパク質を適切なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチド合成法としては、たとえば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。

【0047】

遺伝子工学的手法を利用して宿主内で発現させた本発明のタンパク質若しくはその部分ペプチドは、細胞内外から単離し実質的に純粋で均一なタンパク質として精製することができる。タンパク質の分離、精製は、通常のタンパク質の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせればタンパク質を分離、精製することができる。

【0048】

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。本発明は、これらの精製方

法を用い、高度に精製されたタンパク質も包含する。

【0049】

なお、タンパク質を精製前又は精製後に適当なタンパク修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり部分的にペプチドを除去することもできる。タンパク修飾酵素としては、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼが用いられる。

【0050】

また、本発明は、上記本発明のタンパク質をコードするDNAに関する。本発明のDNAは、*in vivo*、*in vitro*で本発明のタンパク質を製造するのみならず、例えば、哺乳動物、例えばヒトの遺伝子治療に用いることもできる。特に、本発明の遺伝子は、不妊症の遺伝子治療への応用が期待される。遺伝子治療に用いる場合には、本発明のDNAが挿入されたベクターを生体内の標的部位へ投与する。投与方法は、*ex vivo*法であっても、*in vivo*法であってもよい。なお、本発明のベクターには、このように遺伝子治療に用いられるベクターも含まれる。

【0051】

本発明のタンパク質をコードするゲノムDNA又はcDNAは、当業者に周知のハイブリダイゼーション技術を用いて、それぞれゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリー等をスクリーニングして得ることができる。

【0052】

得られたDNA又はDNA断片をプローブとして、さらにゲノムライブラリーやcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、異なる細胞、組織、臓器又は種から遺伝子を得ることができる。ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーは、例えばSambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に記載の方法により調製してもよいし、市販のDNAライブラリーを用いてもよい。

【0053】

また、得られたcDNAの塩基配列を決定することにより、それがコードする翻訳領域を決定でき、本発明のタンパク質のアミノ酸配列を得ることができる。

## 【0054】

具体的には、例えば次のようにすればよい。まず、本発明のタンパク質を発現する細胞、組織、臓器からmRNAを単離する。mRNAの単離は公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC法(Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159)等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia)等を使用して全RNAからmRNAを精製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia)を用いることによりmRNAを直接調製することもできる。

## 【0055】

得られたmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit(生化学工業)等を用いて行うこともできる。また、本明細書に記載されたプローブを用いて、5'-AmplifINDER RACE Kit(Clontech製)およびポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction; PCR)を用いた5'-RACE法(Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932)に従い、cDNAの合成および増幅を行うことができる。

## 【0056】

得られたPCR産物から目的とするDNA断片を調製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法により確認すればよい。

## 【0057】

また、本発明のDNAは、発現に使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現効率の高い配列を設計することができる(Grantham, R. et al., Nucleic Acids Research (1981) 9, r43-r74)。また、本発明のDNAを市販のキットや公知の方法によって改変することができる。例えば、制限酵素による消化、合成オリゴヌクレオチドや適当なDNAフラグメントの挿入、リンカーの付加、開始コード

ン (ATG) 及び／又は終始コドン (TAA、TGA又はTAG) の挿入等が挙げられる。

【0058】

本発明のDNAは、具体的には例えば配列番号：1の塩基配列において48位の塩基Aから1010位の塩基CからなるDNA、配列番号：3の塩基配列において69位の塩基Aから1025位の塩基CからなるDNA、配列番号：5の塩基配列において73位の塩基Aから867位の塩基AからなるDNA、配列番号：7の塩基配列において38位の塩基Aから1000位の塩基AからなるDNA、配列番号：9の塩基配列において41位の塩基Aから1096位の塩基CからなるDNAを包含する。

【0059】

本発明のDNAはまた、配列番号：1、3、5、7または9のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであり、且つ本発明のタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNAを含む。

【0060】

「ストリンジェントな条件」とは、通常、「42℃、2xSSC、0.1% SDS」程度であり、好ましくは「50℃、2xSSC、0.1% SDS」程度であり、さらに好ましくは「65℃、2xSSC、0.1% SDS」程度である。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有するDNAを得ることができる。

【0061】

上記のハイブリダイズするDNAは、例えば天然由来のDNA（例えばcDNA又はゲノムDNA）であってよい。天然由来のDNAの場合、機能的に同等なタンパク質をコードするDNAを単離するための生物としては、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウシ、サル、ブタなどが挙げられる。例えばこれらの生物において、実施例において本発明のタンパク質をコードするcDNAとハイブリダイズするmRNAが検出される組織（例えば精巣）由来のcDNAを用いて本発明のDNAを単離することができる。また、本発明のタンパク質をコードするDNAはcDNAやゲノムDNAの他、合成DNAであってもよい。

【0062】

また、本発明は、本発明のタンパク質の基質のスクリーニング方法に関する。

本発明のタンパク質の「基質」とは、本発明のタンパク質が結合することにより特定の部位で分解または切断を受ける化合物を指す。

【0063】

基質となる化合物としては、タンパク質に制限されない。例えば、トリプシン (trypsin) やキモトリプシン (chymotrypsin) は、タンパク質のみならず、ペプチド化合物の誘導体のアミド結合やエステル結合も切断することが知られている (Farmer, D.A., et al., J Biol Chem. (1975) 250, 7366-7371; del Castillo, L.M., et al., Biochim Biophys Acta. (1971) 235, 358-69)。従って、本発明において、基質としては本発明のタンパク質が結合することにより特定の部位で分解または切断を受ける限り限定されず、ペプチドやその類縁体、誘導体 (ペプチド性化合物)、または非ペプチド性化合物などでもよい。

【0064】

本発明の基質のスクリーニング方法は、(a) 本発明のタンパク質に被検試料を接触させる工程、(b) 本発明のタンパク質の被検試料に対するプロテアーゼ活性を検出する工程、および (c) 本発明のタンパク質のプロテアーゼ活性により分解若しくは切断を受ける化合物を選択する工程、を含む。

【0065】

スクリーニングに使用される被検試料としては、本発明のタンパク質の基質を含むことが期待される試料であれば特に制限はなく、例えば、細胞抽出液、動物組織抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、精製若しくは粗精製タンパク質、ペプチド、ペプチドの類縁体若しくは誘導体、非ペプチド性化合物、合成化合物、天然化合物などが挙げられる。

【0066】

本発明のタンパク質に結合する基質のスクリーニングにおいては、例えば、本発明のタンパク質と被検試料とを混合し、インキュベートした後、被検試料の変化 (切断、分解) を測定する。例えば、タンパク質を被検試料とする場合、被検試料を直接、またはアジド化したり、蛍光物質と結合させ、反応前後の試料の変化をUVスペクトル (R. J. Beynon and J. S. Bond, Proteolytic enzymes (1989) IRL press 25-55) や、HPLC (Maier M, et al. (1988) FEBS Lett. 232, 395-

398, Gau W, et al. Adv Exp Med Biol. (1983) 156, 483-494) で検出し、プロテアーゼ活性を測定することができる。

【0067】

また、ペプチド（及び類縁体、誘導体）を被検試料とする場合、数アミノ酸（1～5アミノ酸の場合が多いが、特に制限はない）からなるペプチド（及び類縁体、誘導体）を本発明のタンパク質と混合し、インキュベート後被検試料の変化を測定する。例えば、被検試料のカルボキシル末端に蛍光性化合物（MEC; Kawabata S, et al. (1988) Eur. J. Biochem. 172, 17-25, AMC; Morita T, et al. (1977) J Biochem (Tokyo). 82, 1495-1498, AFC; Garrett JR, et al. (1985) Histochem. J. 17, 805-817, など）を導入しておき、被検試料が切断を受けた際に生じる蛍光性化合物のスペクトル変化を指標にプロテアーゼ活性を測定すればよい。また、その他の蛍光標識ペプチド基質を用いたスクリーニング方法を用いることもできる（R. J. Beynon and J. S. Bond, Proteolytic enzymes (1989) IRL press 25-55, Gossrau R, et al. (1984) Adv Exp Med Biol. 167, 191-207, Yu JX, et al. (1994) J Biol Chem. 269, 18843-18848）。

【0068】

また、上記方法の原理を利用して、被検化合物として合成化合物、または天然物バンク、ランダムファージペプチドディスプレイライブラリー、もしくはピンペプチド合成物等を用いてスクリーニングすることや、コンビナトリアルケミストリー技術によるハイスループットスクリーニングも可能である（Wrighton NC; Farrell FX; Chang R; Kashyap AK; Barbone FP; Mulcahy LS; Johnson DL; Barrett RW; Jolliffe LK; Dower WJ., Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin, Science (UNITED STATES) Jul 26 1996, 273 p458-64, Verdine GL., The combinatorial chemistry of nature. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p11-13, Hogan JC Jr., Directed combinatorial chemistry. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p17-9）。

【0069】

上記スクリーニング方法を利用して、本発明のタンパク質の基質が単離されれば、本発明のタンパク質の該基質に対するプロテアーゼ活性を阻害する活性を指

標に、本発明のタンパク質の阻害剤をスクリーニングすることができる。従って、本発明は、また、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物をスクリーニングする方法に関する。

## 【0070】

この方法は、(a) 被検試料の存在下で本発明のタンパク質にその基質を接触させる工程、(b) 本発明のタンパク質の該基質に対するプロテアーゼ活性を検出する工程、および(c) 被検試料が非存在下において検出した場合と比較して、該プロテアーゼ活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む。

## 【0071】

スクリーニングに使用される本発明のタンパク質としては、天然のタンパク質、組換えタンパク質、またはそれらの部分ペプチドであってもよい。また、スクリーニングに使用される被検試料としては、特に制限はなく、例えば、細胞培養上清、遺伝子ライブラリーの発現産物、ペプチド、ペプチドの類縁体若しくは誘導体、精製若しくは粗精製タンパク質(抗体を含む)、非ペプチド性化合物、合成化合物、微生物発酵生産物、海洋生物抽出液、植物抽出液、細胞抽出液、動物組織抽出液、が挙げられる。

## 【0072】

本発明のタンパク質の阻害剤のスクリーニングは、例えば、上記文献「R. J. Beynon and J. S. Bond, *Proteolytic enzymes* (1989) IRL press 25-55; Maier M, et al. (1988) *FEBS Lett.* 232, 395-398; Gau W, et al. *Adv Exp Med Biol.* (1983) 156, 483-494; Kawabata S, et al. (1988) *Eur. J. Biochem.* 172, 17-25,; Morita T, et al. (1977) *J Biochem (Tokyo).* 82, 1495-1498; Garret JR, et al. (1985) *Histochem. J.* 17, 805-817; Gossrau R, et al. (1984) *Adv Exp Med Biol.* 167, 191-207, Yu JX, et al. (1994) *J Biol Chem.* 269, 18843-18848」に記載の系を利用して行なうことができる。また、ペプチド性基質をリード化合物とし、その構造の一部を修飾したり置換した化合物を、本発明のタンパク質の阻害剤スクリーニングにおける被検化合物として用いることも可能である(Okamoto S, et al. (1993) *Methods Enzymol.* 222, 328-340)。

## 【0073】



上述したように、本発明のタンパク質は、その発現特性等から、精子の分化・熟成または精子の機能（受精）に関与していることが示唆される。本発明のスクリーニング方法により単離される上記阻害剤は、本発明のタンパク質の受精への関与を解析するために利用しうる。例えば、本発明のタンパク質の阻害剤を用いて、インビトロ受精解析（Y. Toyoda et al., 1971, Jpn. J. Anim. Reprod. 16: 147-151; Y. Kuribayashi et al., 1996, Fertil. Steril. 66: 1012-1017）を行い、該阻害剤が受精を阻害するか否かを検討することにより、本発明のタンパク質の受精への関与を判定することができる。受精を阻害しうる本発明のタンパク質の阻害剤には、例えば、新たな避妊薬としての利用が考えられる。

## 【0074】

本発明のスクリーニング方法を利用して得られる化合物をヒトや他の哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、マントヒヒ、チンパンジーの医薬として使用する場合、常用される手段に従って実施することができる。

## 【0075】

例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば本発明のタンパク質と結合活性を有する化合物を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤とともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

## 【0076】

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムの様な結合剤、結晶性セルロースの様な賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸の様な膨化剤、ステアリン酸マグネシウムの様な潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンの様な甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる

。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油のような天然産出植物油を溶解又は懸濁させるための通常の製剤実施に従って処方することができる。

## 【0077】

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80(TM)、HCO-50と併用してもよい。

## 【0078】

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

## 【0079】

本発明のスクリーニング方法により得られる化合物の投与量は、症状により差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.1から100mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgである。

## 【0080】

非経口的に投与する場合は、その1回の投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.01から30mg、好ましくは約0.1から20mg、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

## 【0081】

また、本発明は、本発明のタンパク質に結合する抗体に関する。このような抗

体は、本発明のタンパク質の検出や精製などに利用しうる。また、上述した *in vitro* 受精解析において利用しうる。抗体は、公知の手段を用いてモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体として得ることができる。

#### 【0082】

本発明のタンパク質に対して特異的に結合する抗体は、タンパク質を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

#### 【0083】

具体的には、本発明のタンパク質に対して特異的に結合するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。

#### 【0084】

例えば、抗体取得の感作抗原として使用される本発明のタンパク質は、その由来となる動物種に制限されないが哺乳動物、例えばヒト、マウス又はラット由来のタンパク質が好ましく、特にヒト由来のタンパク質が好ましい。ヒト由来のタンパク質は、本明細書に開示される遺伝子配列又はアミノ酸配列を用いて得ることができる。

#### 【0085】

本発明において、感作抗原として使用されるタンパク質は、本発明のタンパク質またはその部分ペプチドを用いることができる。タンパク質の部分ペプチドとしては、例えばタンパク質のアミノ基 (N) 末端断片やカルボキシ (C) 末端断片が挙げられる。本発明における「抗体」とはタンパク質の全長又は断片に結合する抗体を意味する。

#### 【0086】

本発明のタンパク質又はその断片をコードする遺伝子を公知の発現ベクター系に挿入して本明細書で述べた宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞内外又は、宿主から目的のタンパク質又はその断片を公知の方法で得、このタンパク質を感作抗原として用いればよい。また、タンパク質を発現する細胞又はその溶解物あるいは化学的に合成した本発明のタンパク質またはその部分ペプチドを感作

抗原として使用してもよい。

## 【0087】

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、一般的にはげっ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が使用される。モノクローナル抗体を作成する場合は、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましい。

## 【0088】

げっ歯目の動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。ウサギ目の動物としては、例えば、ウサギが使用される。霊長目の動物としては、例えばサルが使用される。サルとしては、狭鼻下目のサル（旧世界ザル）、例えば、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等が使用される。

## 【0089】

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS(Phosphate-Buffered Saline)や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に投与し、以降フロイント不完全アジュバントに適量混合した感作抗原を、4～21日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを常法により確認する。

## 【0090】

ここで、本発明のタンパク質に対するポリクローナル抗体を得るには、血清中の所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出す。この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としてポリクローナル抗体を含む血清を使用してもよいし、必要に応じこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離してもよい。

## 【0091】

モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物の血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を取り出し、細胞融合に付せばよい。この際、細胞融合に使用される好ましい免疫細胞として、特に脾細胞が挙げられる。前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としては、好ましくは哺乳動物のミエローマ細胞が挙げられる。

【0092】

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、例えば、ミルステインらの方法(Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

【0093】

細胞融合により得られたハイブリドーマは、通常を選択培養液、例えばHAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングが行われる。

【0094】

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球、例えばEBウイルスに感染したヒトリンパ球をin vitroでタンパク質、タンパク質発現細胞又はその溶解物で感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、タンパク質への結合活性を有する所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる（特開昭63-17688号公報）。

【0095】

さらに、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるタンパク質、タンパク質発現細胞又はその溶解物を免疫して抗体産生細胞を取得し、これをミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを用いてタンパク質に対するヒト抗体を取得してもよい（国際公開92-03918号、国際公開93-2227号、国際公開94-02602号、国際公開94-25585号、国際公開96-33735号および国

際公開96-34096号参照)。

【0096】

ハイブリドーマを用いて抗体を産生する以外に、抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞を癌遺伝子(oncogene)により不死化させた細胞を用いてもよい。

【0097】

このように得られたモノクローナル抗体はまた、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体として得ることができる(例えば、Borrebaeck, C. A. K. and Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照)。組換え型抗体は、それをコードするDNAをハイブリドーマ又は抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させる。本発明は、この組換え型抗体を包含する。

【0098】

本発明の抗体は、本発明のタンパク質に結合するかぎり、その抗体断片や抗体修飾物であってよい。例えば、抗体断片としては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv又はH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv) (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883)が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる(例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照)。

【0099】

抗体修飾物として、ポリエチレングリコール(PEG)等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を

施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

【0100】

また、本発明の抗体は、公知の技術を使用して非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域からなるキメラ抗体又は非ヒト抗体由来のCDR（相補性決定領域）とヒト抗体由来のFR（フレームワーク領域）及び定常領域からなるヒト型化抗体として得ることができる。

【0101】

前記のように得られた抗体は、均一にまで精製することができる。本発明で使用する抗体の分離、精製は通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定又は酵素結合免疫吸着検定法(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 等により行うことができる。

【0102】

また、本発明の抗体の抗原結合活性を測定する方法として、ELISA、EIA(酵素免疫測定法)、RIA(放射免疫測定法)あるいは蛍光抗体法を用いることができる。例えば、ELISAを用いる場合、本発明の抗体を固相化したプレートに本発明のタンパク質を添加し、次いで目的の抗体を含む試料、例えば、抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。酵素、例えばアルカリフォスファターゼ等で標識した抗体を認識するに次抗体を添加し、プレートをインキュベーション、洗浄した後、p-ニトロフェニルリン酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。タンパク質としてタンパク質の断片、例えばそのC末端からなる断片あるいはN末端からなる断片を使用してもよい。本発明の抗体の活性評価には、BIAcore(Pharmacia製)を使用することができる。

【0103】

これらの手法を用いることにより、本発明の抗体と試料中に含まれる本発明のタンパク質が含まれると予想される試料とを接触させ、前記抗体とタンパク質との免疫複合体を検出又は測定することからなる本発明のタンパク質の検出又は測定方法を実施することができる。本発明のタンパク質の検出又は測定方法は、タ

ンパク質を特異的に検出又は測定することができるため、タンパク質を用いた種々の実験等に有用である。

## 【0104】

また、本発明は、配列番号：1、3、5、7または9に示される塩基配列からなるDNA（その相補鎖を含む）と特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するDNAに関する。ここで「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、他のタンパク質をコードするDNAとクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことを指す。このようなDNAは、本発明のタンパク質をコードするDNAを検出、単離するためのプローブとして、また増幅するためのプライマーとして利用可能である。特異的なハイブリダイゼーションのためのストリンジェンシーは、ハイブリダイズ反応の温度、反応時間、プローブ又はプライマー濃度、プローブ又はプライマーの長さ、塩強度などを考慮することにより、当業者であれば適宜選択することができる。

## 【0105】

本発明のマウス「Tespec PRO-1」および「Tespec PRO-2」遺伝子は精巣に特異的に発現し、またマウスにおいて生後18日以降、生殖細胞に特異的に発現していると考えられる。このため、これらのDNAは生殖細胞のマーカー（検査薬）としても利用することが可能である。また、本発明の遺伝子は、精子の分化・成熟、および／または受精の成立を含む精子の機能に関与している可能性が考えられるため、これらDNAは、不妊症の検査に利用することも考えられる。

## 【0106】

また、「配列番号：1、3、5、7または9に示される塩基配列からなるDNA（その相補鎖を含む）と特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するDNA」には、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイムも含まれる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、本発明のタンパク質の産生細胞に作用して、該タンパク質をコードするDNA又はmRNAに結合することにより、その転写又は翻訳を阻害したり、mRNAの分解を促進したりして、本発明のタンパク質の発現を抑制することにより、結果的に本発明のタンパク質の作用を抑制する効果



を有する。アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、例えば、配列番号：1、3、5、7または9に示される塩基配列中のいずれかの箇所にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは配列番号：1、3、5、7または9に示される塩基配列中の連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。さらに好ましくは、前記連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドが翻訳開始コドンを含む、前記のアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0107】

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、それらの誘導体や修飾体を使用することができる。このような修飾体として、例えばメチルホスホネート型又はエチルホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾体、ホスホロチオエート修飾体又はホスホロアミデート修飾体等が挙げられる。

【0108】

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、DNA又はmRNAの所定の領域を構成するヌクレオチドに対応するヌクレオチドが全て相補的であるもののみならず、DNA又はmRNAとオリゴヌクレオチドとが配列番号：1、3、5、7または9に示される塩基配列に選択的に安定にハイブリダイズできる限り、1又は複数個のヌクレオチドのミスマッチが存在していてもよい。このようなDNAとしては、少なくとも15個の連続したヌクレオチド配列領域で、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有するものを示す。なお、相同性を決定するためのアルゴリズムは、上記した文献に記載のアルゴリズムを使用すればよい。

【0109】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、それらに対して不活性な適当な基剤と混和して塗布剤、パップ剤等の外用剤とすることができる。また、必要に応じて、賦形剤、等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、無痛化剤等を加えて錠剤、散財、顆粒剤、カプセル剤、リポソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻剤など、さらに凍結乾燥剤とすることができる。これらは常法にしたがって調製することができる。

【0110】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は *in vivo* でも *in vitro* でも適用できる。また、患者の患部に直接適用するか、又は血管内に投与するなどして結果的に患部に到達し得るように患者に適用してもよい。さらには、持続性、膜透過性を高めるアンチセンス封入素材を用いることもできる。例えば、リポソーム、ポリ-L-リジン、リピッド、コレステロール、リポフェクチン又はこれらの誘導体が挙げられる。

【0111】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体の投与量は、患者の状態に応じて適宜調整し、好ましい量を用いることができる。例えば、0.1~100mg/kg好ましくは0.1~50mg/kgの範囲で投与することができる。

【0112】

【実施例】

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0113】

【実施例1】 「Tespec PRO-1」 遺伝子断片の単離

Mouse heart cDNA plasmid library (GIBCO社,  $5 \times 10^9$  cfu/ml) から、 $5 \times 10^4$  クローンからなるプラスミドを単離、精製し、これを鋳型として、本発明者らが「76A5sc2」と命名した遺伝子に由来する遺伝子特異的プライマー「76A5sc2-B」とベクタープライマー「SPORT RV」を用いて以下の様にPCRをおこなった。

【0114】

SuperScript Mouse heart cDNA library 及び SuperScript Mouse testis cDNA library (GIBCO社,  $5 \times 10^9$  cfu/ml) を100倍に希釈したものを、16本の3ml LB-Amp培地に1 $\mu$ lずつ加え、30℃で培養したのちQIASpin mini prep kit (QIAGEN社) でプラスミドを得た(このプラスミドにはそれぞれ $5 \times 10^4$ の独立なクローンが存在する)。マウス心臓由来のプラスミドを鋳型とし、76A5sc2-B(配列番号: 11/5' GAT CMA CAG GTG CCA GTC ATC A 3')とSPORT SP6(配列番号: 12/5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA 3')のプライマーで、Ampli Taq Gold (Perkin Elm

er社)をポリメラーゼとして用い、95℃ 12分の後、「96℃, 20秒、55℃, 20秒、72℃, 2分」×40サイクル、続いて72℃ 3分の条件でPCRをおこなった。

【0115】

PCR反応液を1.5% アガロースゲルで電気泳動を行い約0.7KbのPCR生成物を切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社)でPCR生成物を回収した。このPCR生成物をpGEM T easy vector (PROMEGA社)にT4 DNA ligase (PROMEGA社)を用いてTAクローニングした。

【0116】

出現したコロニーから8つを選択し、コロニーPCRにより挿入断片を以下のようにして増幅した。

【0117】

SPORT FW (配列番号: 13/5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3'), SPORT RV (配列番号: 14/5' CAG GAA ACA GCT ATG ACC 3')及びKOD dash ポリメラーゼを含む20μlのPCR反応溶液に組み替え体を持つコロニーを直接懸濁し、94℃ 1分の後、「96℃ 15秒、55℃ 5秒、72℃ 25秒」を32サイクルの条件でPCRをおこなった。

【0118】

増幅されたPCR生成物はアガロースゲル電気泳動で確認し、必要に応じてPCR生成物をMicrospin S-300あるいはS-400ゲルろ過(Pharmacia社)で精製した。

【0119】

シーケンス反応のテンプレートとして、上記のコロニーPCRやRT-PCRなどのPCR産物を用いてシーケンスを行った。PCR反応後アガロースゲル電気泳動で生成物を確認し、夾雑物が混入している場合はアガロースゲルより目的PCR産物を切り出し、そうでない場合は上記のゲルろ過で精製した。シーケンス反応はDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit、dRhodamine Terminator Cycle Sequencing FS ready Reaction Kit、またはBigDye Terminator Cycle Sequencing FS ready Reaction Kit (Perkin-Elmer社)を用いたサイクルシーケンスを行った。プライマーには、SPORT FWおよびSPORT RVを用いた。未反応のプライマー、ヌクレオチド等を96 well precipitation HL kit (AGTC社)で

除去し、ABI 377あるいはABI 377XL DNA Sequencer (Perkin -Elmer社)で塩基配列を決定した。

【0120】

その結果、7つは76A5sc2由来の塩基配列であったが、1つは（インサートサイズ約0.5Kb）異なる塩基配列を持っていた。そこでこの塩基配列をGCGのデータベースサーチで解析した。また、この塩基配列はORFが開いていたのでアミノ酸に翻訳し、アミノ酸配列もGCGのデータベースで解析した。その結果、この遺伝子断片は核酸及びアミノ酸レベルで多数の既知トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ（trypsin family serine proteinase）と一部の領域で相同性を持っていることが判明した。しかしこの遺伝子断片の全領域において高い相同性を示す既知遺伝子はなく、新規な遺伝子であることが判明した。また、このアミノ酸配列はトリプシンファミリーセリンプロテアーゼモチーフである「Trypsin-His (PROSITE PS00134)」モチーフを有することが判明し、新規なプロテアーゼの断片であることが示唆された。

【0121】

【実施例2】 「Tespec PRO-1」遺伝子の全長cDNAのクローニング

実施例1において SuperScript Mouse heart cDNA libraryより得たプラスミドをテンプレートとし、実施例1で単離された遺伝子断片より新たにデザインしたNo9-C（配列番号：15/5' ATG CTT CTG CTA TCG TGG AAG G 3'）とベクタープライマーSPORT FWあるいはSPORT T7（配列番号：16/5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'）のプライマーセット、及び該遺伝子断片より新たにデザインしたNo9-B（配列番号：17/5' CTT TGT GCT GAG GTC TTC AGT G 3'）とベクタープライマーSPORT RVのプライマーセットでAmpli Taq Goldをポリメラーゼとして用いてplasmid library RACEをおこなった。PCR反応は 95℃ 12分の後、「96℃ 20秒、55℃ 20秒、72℃ 5分」×42サイクル、次いで72℃ 3分の条件でおこなった。

【0122】

PCR反応液をアガロースゲルで電気泳動し、PCR産物の確認を行った。さらにこれらPCR産物について、直接またはpGEM T easy vectorにクローニングしたのち

塩基配列を決定した。

【0123】

3' RACEをおこなったところ、2つのPCRバンドが得られたのでその塩基配列を決定した。一方のバンドの塩基配列は他方のバンドの塩基配列の途中にpoly Aが付加したものであった。

【0124】

一方、5' RACEの結果も同様に、PCR産物は長短2つのバンドを与えたので、それぞれのバンドをサブクローニングした後、塩基配列を決定した。その結果、この両者の3'側の塩基配列は同一であり、スプライシングアイソフォーム (splicing isoform) であることが判明した。

【0125】

5' RACEで出現した短い方のバンドと、3' RACEの長い方のバンドの塩基配列をつなぎあわせることによりプロテアーゼをコードする塩基配列が得られたので、これを「Tespec PRO-1」 (Testis specific expressed serine proteinase-1) と名付けた。

【0126】

得られた「Tespec PRO-1」 cDNAは1033塩基で、321アミノ酸をコードしていると予想される(図1)。その塩基配列を配列番号: 1に、アミノ酸配列を配列番号: 2に示す。アミノ酸配列にはN末端にシグナルペプチドと思われる疎水性アミノ酸領域が存在し、またC末端にも疎水性アミノ酸に富む領域が存在していた。このアミノ酸配列はGCGでの解析結果からトリプシンファミリーセリンプロテアーゼモチーフである「Trypsin-His (PROSITE PS00134)」および「Trypsin-Ser (PROSITE PS00135)」を持つことが判明した。PROSITEによれば、「あるタンパク質がセリンおよびヒスチジン活性化部位の両方を有している場合は、そのタンパク質がトリプシンファミリーセリンプロテアーゼである確率は100%である ("if a protein includes both the serine and histidine active site signatures, the probability of it being a trypsin family serine protease is 100%") 」とされている (S. Brenner, 1988, Nature 334: 528-530; N.D. Rawlings and A.J. Barrett, 1994, Meth. Enzymol. 244: 19-61) ため、「Tespec

PRO-1」はトリプシンファミリーセリンプロテアーゼであると考えられる。この遺伝子について塩基配列及びアミノ酸配列についてGCGのデータベースサーチをおこなった。その結果上述の2つのモチーフとその近傍ではアクロシンやプロスタシン、トリプシンなど既知のトリプシンファミリーセリンプロテアーゼと高い相同性を示し、またプロテアーゼ活性に必要なアスパラギン酸残基や、プロテアーゼ活性に必要と思われる分子内ジスルフィド結合に必要なシステインの位置も他のプロテアーゼと比較してよく保存されていた(図3)。しかしそれ以外の領域においては、核酸およびアミノ酸レベルで高い相同性を示す既知の遺伝子、タンパク質は存在せず、新規なトリプシンファミリーセリンプロテアーゼであることが判明した。

【0127】

[実施例3] 「Tspec PRO-2」遺伝子の全長cDNAのクローニング

実施例2において「Tspec PRO-1」のクローニングの際の5' RACEで取得できた分子量の大きいバンド(5'側で「Tspec PRO-1」ではない塩基配列を持つ)について、その塩基配列より新たに合成したプライマー(No9-GあるいはNo9-J)を用いて、実施例1に示した SuperScript Mouse testis cDNA libraryから得たプラスミドをテンプレートとし、更に3'及び5' RACEをおこなった。

【0128】

具体的には、No9-G(配列番号: 18/5' CAG TCA ATG TCA CTG TGG TCA T 3')とSPORT FW、及びNo9-J(配列番号: 19/5' ACT TGC CGT TGG TGC CCA CTT C 3')とSPORT RVのプライマーセットでAmpli Taq Goldをポリメラーゼとして用い、95℃ 12分の後、「96℃ 20秒、55℃ 20秒、72℃ 5分」×42サイクル、次いで72℃ 3分の条件でPCRをおこなった。

【0129】

PCR産物について、直接またはpGEM T easy vectorにクローニングしたのち塩基配列を決定した。

【0130】

3' RACEをおこない、2つの3' RACE 産物を得た。両者の塩基配列を決定したところ、両者とも5'側の塩基配列は同一であるが、3'側の塩基配列が異なってい

た。一方は上述した「Tespec PRO-1」の塩基配列の途中にpoly Aが付加したものと同一であった。他方の3'側の塩基配列は「Tespec PRO-1」のものとは異なる配列を持っていた。

【0131】

5' RACEをおこなうと、マルチバンドを与えたのでサブクローニングをした後、それらの塩基配列を決定した。その結果これらはすべて3'側の配列が共通であり、スプライシングアイソフォームであることが判明した。その内の1つは長いORFが開いており、この5' RACE産物と、先に述べた3'側の塩基配列が「Tespec PRO-1」のものとは異なる3' RACE産物をつなぎあわせることにより、プロテアーゼをコードすると思われる塩基配列が得られたので、これを「Tespec PRO-2」と名付けた。その塩基配列を配列番号：3に、アミノ酸配列を配列番号：4に示す。

【0132】

得られた「Tespec PRO-2」cDNAは1034塩基で（図2）、5'非コード領域は68塩基であるのに対し3'非コード領域が9塩基と非常に短かく、またpoly AシグナルもGATAAAと一般のmRNA（AAUAAA）よりも弱いと思われる。このcDNAより「Tespec PRO-2」は319アミノ酸をコードすると予想され、そのアミノ酸配列はN末端にシグナルペプチドと思われる領域が存在するが、「Tespec PRO-1」とは異なりC末端には疎水性アミノ酸に富む領域は存在しない。またこのアミノ酸配列はトリプシンファミリーセリンプロテアーゼモチーフである「Trypsin-His」を持つが、「Trypsin-Ser」については12アミノ酸よりなるモチーフ（[DNSTAGC] - [GSTAPIMVQH] - X - X - G - [DE] - S - G - [GS] - [SAPHV] - [LIVMFYWH] - [LIVMFYSTANQH]）中、2アミノ酸がこのコンセンサスから外れている（GKCQG DSGAPMV）。しかし既知のトリプシンファミリーセリンプロテアーゼにおいても、コンセンサス配列から数アミノ酸異なった配列を持つものも存在するため、取得した「Tespec PRO-2」も、プロテアーゼとして機能するものと思われる。

【0133】

「Tespec PRO-2」についても塩基配列及びアミノ酸配列について、GCGのデータベースサーチをおこなった。その結果、「Tespec PRO-1」同様上述の2つのモ

チーフとその近傍では、既知のトリプシンファミリーセリンプロテアーゼと高い相同性を示し、またプロテアーゼ活性に必要なアスパラギン酸残基や、プロテアーゼ活性に必要なと思われる分子内ジスルフィド結合に必要なシステインの位置も他のプロテアーゼと比較してよく保存されていたが（図3）、それ以外の領域においては、核酸およびアミノ酸レベルで高い相同性を示す既知の遺伝子、タンパク質は存在せず、新規なトリプシンファミリーセリンプロテアーゼであることが判明した。

【0134】

【実施例4】 「Tespec PRO-1」 および「Tespec PRO-2」 のスプライシングアイソフォーム

「Tespec PRO-1」と「Tespec PRO-2」の核酸及びアミノ酸レベルでの相同性はそれぞれ52.2%、33.1%であった。これらの値は他の既知トリプシンファミリーセリンプロテアーゼに対する相同性と同程度である。

【0135】

実施例3の5' RACEで取得できた「Tespec PRO-2」のスプライシングアイソフォームは、スプライシングジャンクション部分や「Tespec PRO-2」では使用されない領域の塩基配列に終止コドンが現れ、長いORFを見出すことはできずプロテアーゼをコードしていないと考えられた。スプライシングアイソフォームを、RT-PCRを用いて以下の様により詳しく解析した。

【0136】

cDNAクローニングによって得られた塩基配列を基に、No9-P（配列番号：20／5' GCA CTG GAA TGA CAA CAT GAT GC 3'）、No9-Q（配列番号：21／5' ATT G GC GTG GCA AGT AGG AGC A 3'）、No9-N（配列番号：22／5' CGA GTC TCC CAG TTA GCA CAG A 3'）、No9-M'（配列番号：23／5' CGG TGA CTT GGT CAT GTC TG T G 3'）、No9-K（配列番号：24／5' GGA TCC ATG AAA CGA TGG AAG GAC AGA A G 3'）、No9-G、No9-J、No9-O（配列番号：25／5' CGC AGA GTT CTG CTC ATA CAT A 3'）の各プライマーを合成した。これらを用い、マウスの組織より調製した cDNAをテンプレートとして、Ampli Taq Goldをポリメラーゼとして、95℃ 12分の後、「96℃ 20秒、60℃ 20秒、72℃ 1分」を40サイクル、次いで72℃ 3分の



条件でRT-PCRをおこなった。PCR反応液は1.5% Seakem GTGアガロース(TaKaRa社)で電気泳動を行った。

【0137】

RT-PCRによる解析の結果(図4および5)、「Tespec PRO-2」のスプライシングアイソフォームのうち、5'側がBox 2-I~2-III~2-VIというアイソフォームが主要であると思われ、「Tespec PRO-2」よりその存在は多いと思われる。また、Box 2-Iを使用したアイソフォームとしては、Box 2-VIを経てBox 2-VIIあるいはBox 1-IIへとつながっていくcDNA(後者は「Tespec PRO-1」とのキメラcDNAと思われる)がRT-PCRで確認できたが、Box 2-IIbを使用したアイソフォームとしては、Box 2-VIを経てBox 1-IIへとつながっていく「Tespec PRO-1」とのキメラ型のcDNAのみが確認できた(図4および5)。このことは、「Tespec PRO-2」と「Tespec PRO-1」が染色体上で非常に接近しており、また「Tespec PRO-2」のpolyAシグナルが弱いために起きているものと思われる。また、このような一見無意味と思われるような(短いタンパク質しかコードできない)スプライシングアイソフォームが存在する意義は不明であるが、「Tespec PRO-2」の発現が転写時のみならずスプライシングによっても制御されている可能性も考えられる。

【0138】

[実施例5] 「Tespec PRO-1」及び「Tespec PRO-2」遺伝子発現の組織分布

「Tespec PRO-1」と「Tespec PRO-2」の発現がどの組織で見られるかをRT-PCRで確認した。成体マウスの10種の組織(肝臓、脳、胸腺、心臓、肺、脾臓、精巣、子宮、腎臓、10~11日目胎児)より単離した全RNA(Ambion社)をSuperScript II(GIBCO社)を逆転写酵素として用い、(dT)<sub>30</sub>VNプライマーでcDNA合成をしRT-PCRのテンプレートとした。また、QUICK-Clone cDNA mouse 7day embryo, 17day embryo(CLONTECH社)もRT-PCRのテンプレートとして用いた。

【0139】

「Tespec PRO-1」特異的プライマーとしてNo9-A(配列番号: 26/5' GGC ATG TAG CTC ACT GGC ATG 3')とNo9-Bを、「Tespec PRO-2」特異的プライマーとして29(-)(配列番号: 27/5' GGA CCA GCA AGA ATC AGT TCT G 3')と17(+)/95(+)(配列番号: 28/5' CTG CTA CCA GTT CTA ATT TGC C 3')を用いた。G3PDHの

コントロールプライマーとしてG3PDH 5' (配列番号: 29/5' GAG ATT GTT GCC ATC AAC GAC C 3')とG3PDH 3' (配列番号: 30/5' GTT GAA GTC GCA GGA GAC AAC C 3')を用いた。Ampli Taq Goldをポリメラーゼとして、95℃ 12分の後、「96℃ 20秒、60℃ 20秒、72℃ 30秒」×42サイクル (G3PDHの場合は28サイクル)、次いで72℃ 3分の条件でPCRをおこなった。PCR反応液は1.5% Seakem GTGアガロース (TaKaRa社)で電気泳動を行った。

【0140】

その結果、「Tespec PRO-1」及び「Tespec PRO-2」の両者とも精巢で高い発現が確認された (図6)。興味深いことに、この遺伝子はマウス心臓 cDNA プラスミドライブラリーよりクローニングしたにもかかわらず、心臓での発現はほとんどないことが判明した。また、精巢以外の組織においても、目的とする大きさのバンドが非常に弱いながらも観察された。

【0141】

さらに、「Tespec PRO-1」のコーディング領域の一部 (Box 1-IIを完全に含む領域、110~401核酸残基)、及び「Tespec PRO-2」のexon2-VI付近 (340~723核酸残基) (「Tespec PRO-2」には多くのスプライシングアイソフォームが存在し、このプローブはそれらの共通領域であるので「Tespec PRO-2」特異的なプローブではなく、「Tespec PRO-2」及びそのスプライシングアイソフォームを認識するものである)をプローブとしてmouse MTN blot (CLONTECH社)による組織分布を解析した。

【0142】

成体マウス精巢のcDNAをテンプレートとし、No9-AとNo9-Bのプライマーで増幅したRT-PCR生成物をMegaprime DNA labelling system (Amersham社)を使用し [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTPでラベリングし、未反応の [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTPを除去したものを「Tespec PRO-1」プローブとした。同様にNo9-GとNo9-Jのプライマーで増幅した後、 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTPでラベリングしたものを「Tespec PRO-2」プローブとした。Mouse Multiple Tissue Northern (MTN) blotおよびMouse Embryo Multiple Tissue Northern (MTN) blot (CLONTECH社)を用い、ExpressHyb Hybridization Solution (CLONTECH社)中で、添付マニュアルの方法に従い、68℃でハイブリダイゼーション

を行った。

【0143】

「Tespec PRO-1」のプローブを用いたところ、精巣にのみ約1.2Kbのバンドが観察できた（図7）。また、精巣以外の組織や胎児期にはこのバンドは観察できなかった。「Tespec PRO-2」のプローブを用いたところ、「Tespec PRO-1」と同様に精巣にのみ約1.2Kbのバンドが観察でき（図7）、精巣以外の組織や胎児期ではバンドは観察できなかった。

【0144】

以上の結果より「Tespec PRO-1」及び「Tespec PRO-2」の両者は精巣特異的な発現をしていることが判明した。

【0145】

【実施例6】 「Tespec PRO-1」及び「Tespec PRO-2」遺伝子の精巣での発現時期

マウスにおいて原始生殖細胞は受精後7日目の胎児において出現し、生殖巣への移動（受精後11日目）後、前精原細胞へと分化をする（受精後13日目）。この前精原細胞はそれ以降停止期に入るが、出生後生殖幹細胞である精原細胞として自己増殖と精子への分化を開始する。精原細胞から精母細胞、精子細胞を経て熟成した精子へと分化するのに約34日かかる（実際には精原細胞にも分化段階があるためそれを含めると約42日である）。そのため出生後のマウスの精巣を経日的に採取し、そこでの「Tespec PRO-1」及び「Tespec PRO-2」遺伝子の発現を確認することで、これらの遺伝子がどの分化段階の精子で発現しているか、あるいは精巣内の支持細胞（セルトリ細胞やラディッヒ細胞）で発現しているかが判明する。

【0146】

一方、突然変異体のマウスとして第5染色体異常に起因するW (White spotting) がある (P. Besmerら (1993) Dev. Suppl., 125-137)。これは精原細胞及び精母細胞に発現する受容体型チロシンキナーゼであるc-kitに異常のある変異体で、これにより精巣内のセルトリ細胞やラディッヒ細胞などの支持細胞は正常であるにもかかわらず、生殖細胞が欠損したり（完全変異型）、精原細胞以降の分化

が不全となったり（不完全変異型）する。そこでこの変異体マウスW/W<sup>v</sup>の精巣での「Tespec PRO-1」及び「Tespec PRO-2」の発現も確認した。

## 【0147】

出生後4日、8日、12日、18日、42日のマウス精巣より単離した全RNA、及び生後56日目の異なる3匹のW/W<sup>v</sup>マウス精巣より単離した全RNAを用いて作成したcDNAをテンプレートとしてRT-PCRをおこなった。このとき同時に成体マウスの精巣、肝臓由来のcDNAを用いたRT-PCRも実施した。プライマーは上記実施例5の「Tespec PRO-1」特異的プライマー、「Tespec PRO-2」特異的プライマーを使用し、40サイクル（G3PDHは29サイクル）のPCRを実施例5と同様に行った。

## 【0148】

RT-PCRの結果、「Tespec PRO-1」及び「Tespec PRO-2」は生後18日目以降の精巣で発現の上昇が見られたが、両遺伝子とも生後12日目以前及びW/W<sup>v</sup>変異体マウスの精巣では発現が全く認められなかった（図8）。またネガティブコントロールとしておこなった肝臓においても、発現は確認できなかった。以上の結果は、「Tespec PRO-1」及び「Tespec PRO-2」の両者の発現が、セルトリ細胞やラディッヒ細胞のような支持細胞ではなく、生殖細胞が分化した精母細胞あるいは減数分裂後の精子細胞あたりから上昇していることを示唆する。

## 【0149】

[実施例7] ヒト「Tespec PRO-2」全長 cDNA のクローニング

マウス「Tespec PRO-2」の塩基配列を基にしてヒト「Tespec PRO-2」のクローニングをおこなった。ヒト精巣poly A<sup>+</sup> RNA（CLONTECH社）をSuperScript II（GIBCO社）を逆転写酵素として用い、(dT)<sub>30</sub> VNプライマーでcDNA合成をしRT-PCRのテンプレートとし、マウス「Tespec PRO-2」由来のNo9-GとNo9-QをプライマーとしてAmpliTaqGoldをポリメラーゼとして、95℃ 12分の後、「96℃ 20秒、55℃ 20秒、72℃ 30秒」×42サイクル、次いで72℃ 3分の低ストリンジェンシーの条件でPCRをおこなった。

## 【0150】

その結果得られたRT-PCR産物について、直接塩基配列を決定した。その結果

、このPCR産物はマウス「Tespec PRO-2」の塩基配列と約 80%の相同性を持つ、ヒト「Tespec PRO-2」の遺伝子断片であることが判明した。この塩基配列を基に 5' RACE用プライマーとしてh-B (配列番号：31/5' AGA GGT CAC TGT CGA GCT GGG 3')、h-D (配列番号：32/5' TGT GAA TAA TGA CCT TCT GCA C 3')を、3' RACE用プライマーとしてh-A (配列番号：33/5' TTC AGC AAC ATC CAC TCG GAG A 3')、h-C (配列番号：34/5' AAG CAA GTG CAG AAG GTC ATT A 3')を作成し、human tesitis Marathon ready cDNA (CLONTECH社)をテンプレートとして、添付マニュアルの方法に従いネステッド (nested) 3'及び5' RACEを実施した。その結果、ヒト「Tespec PRO-2」の全長cDNAをクローニングすることに成功した。その塩基配列を配列番号：5に、アミノ酸配列を配列番号：6に示す。

## 【0151】

ヒト「Tespec PRO-2」のcDNAは1035塩基で、265アミノ酸をコードしていると予想される(図9)。ヒト及びマウス「Tespec PRO-2」では、核酸及びアミノ酸レベルで互いにそれぞれ74.2%、69.8%の相同性を持つが、マウス「Tespec PRO-2」に比較してアミノ酸配列のC末端が54残基短く、それに伴い核酸配列の3'非コード領域が長くなっている(図10, 11)。また、N末端にはシグナルペプチドと思われる領域が存在し、C末端領域も疎水性アミノ酸に富んでいる。ヒト「Tespec PRO-2」の予想されるアミノ酸配列には、トリプシンファミリーセリンプロテアーゼモチーフである「Trypsin-His」を持つ。更に「Trypsin-Ser」については12アミノ酸よりなるモチーフ([DNSTAGC] - [GSTAPIMVQH] - X - X - G - [DE] - S - G - [GS] - [SAPHV] - [LIVMFYWH] - [LIVMFYSTANQH])中、1アミノ酸(GIFKGDSGAPLV)がこのコンセンサスから外れている(マウス「Tespec PRO-2」では12アミノ酸モチーフ中2アミノ酸がコンセンサスから外れている)。

## 【0152】

データベースサーチの結果、取得したヒト「Tespec PRO-2」は、核酸およびアミノ酸レベルで高い相同性を示す既知の遺伝子、タンパク質は存在せず、新規なトリプシンファミリーセリンプロテアーゼであることが判明した。

## 【0153】

【実施例 8】 ヒト「Tespec PRO-2」の染色体マッピング

ヒト染色体パネル(CORRIELL CELL REPOSITORIES社製)をテンプレートとし、h-Aとh-F (配列番号: 35/5' CAT TGG TCG TTA CCC ACT GTG C 3')のプライマーで、Advantage cDNA polymerase (CLONTECH社)をポリメラーゼとして、95℃ 1分の後、「96℃ 15秒、60℃ 15秒、68℃ 30秒」×37サイクル、次いで68℃ 3分の条件でPCRをおこなった。PCR反応液は1.5% Seakem GTGアガロース(TaKaRa)で電気泳動を行った。

【0154】

電気泳動の結果を基に染色体マッピングを行った結果、ヒト「Tespec PRO-2」は第8染色体上に存在することが判明した(図12)。

【0155】

【実施例 9】 ヒト「Tespec PRO-3」遺伝子の全長 cDNAクローニング

ヒト精巣poly A+ RNA (CLONTECH社)をSuperScript II (GIBCO社)を逆転写酵素として用い、(dT)<sub>30</sub>VNプライマーでcDNA合成をしRT-PCRのテンプレートとし、マウス「Tespec PRO-1」由来の塩基配列より合成したPRO1-E (配列番号: 36/5' ATT CTC AAT GAG TGG TGG GTT CT 3')とPRO1-D (配列番号: 37/5' CCA GCA CAC AGC ATA TTC TTG G 3')をプライマーとして用い、AmpliTaqGoldをポリメラーゼとして、95℃ 12分の後、「96℃ 20秒、50℃ 20秒、72℃ 45秒」×5サイクル、次いで「96℃ 20秒、60℃ 20秒、72℃ 45秒」×35サイクル、次いで72℃ 3分の低ストリンジェンシーの条件でPCRをおこなった。

【0156】

その結果得られたRT-PCR 産物をゲルろ過後、塩基配列を決定したところ、トリプシンファミリーセリンプロテアーゼをコードする遺伝子断片であることが判明した。この遺伝子断片をアミノ酸に翻訳するとそのアミノ酸配列には「Trypsin-His」のモチーフが含まれていた。この遺伝子断片の塩基配列のデータベースサーチをおこなったところ、ヒト EST (AA781356、aj25c04.s1 Soares - testis - NHT Homo sapiens cDNA clone 1391334 3', mRNA sequence.)と一部重なり合うことが判明した。このESTをアミノ酸に翻訳すると「Trypsin-Ser」モチーフが存在した。そこで得られた遺伝子断片の塩基配列を基に、5' RACE用プライマーと

してhPRO3-B（配列番号：38／5' GGA AAC AGC TCC TCG GAA TAT AAG C 3'）およびhPRO3-D（配列番号：39／5' TGG ATG GGC TAG TTA AGT CGT TGG T 3'）を、3' RACE用プライマーとしてhPRO3-A（配列番号：40／5' TTC GAG GGA AGA AC T CGG TAT TC 3'）およびhPRO3-C（配列番号：41／5' TGT GAA AAC GGA TCT G AT GAA AGC G 3'）を作製し、human testis Marathon ready cDNA（CLONTECH社）をテンプレートとして、添付のマニュアルの方法に従い nested RACEを実施し、全長 cDNAのクローニングをおこなった。RACE産物を直接またはpGEM T easy vectorにサブクローニングしてその塩基配列を決定した。その塩基配列を配列番号：9に、アミノ酸配列を配列番号：10に示す。

【0157】

この新規ヒト遺伝子は、マウス「Tespec PRO-1」の塩基配列より合成したプライマーを用いて得られたにもかかわらず、マウス「Tespec PRO-1」よりもデータベース中のマウス精巣（mouse testis）EST（AA497965、AA497934、AA497919等）に、より相同性が高かった（図14）。そこで、この遺伝子をヒト「Tespec PRO-3」と名付けた。

【0158】

ヒト「Tespec PRO-3」のcDNAは1123塩基で、352アミノ酸をコードしていると予想される（図13）。N末端にはシグナルペプチドと思われる配列が存在し、「Trypsin His」及び「Trypsin-Ser」モチーフを有していた。また分子内ジスルフィド結合をしていると思われるCys 残基も他のセリンプロテアーゼと比較してよく保存されていた。

【0159】

[実施例10] マウス「Tespec PRO-3」遺伝子の全長 cDNAクローニング

上述したヒト「Tespec PRO-3」のマウスカウンターパートであるマウス「Tespec PRO-3」は、上述の数個のマウス精巣 ESTの塩基配列を含む遺伝子であると思われる。この遺伝子のマウス ESTは合計8つデータベースに登録されており、4つは精巣由来、1つは腎臓由来、残りの3つは組織不明のcDNA由来であった。そこでこれらのESTからプライマーを作成し、mouse testis Marathon ready cDNAをテンプレートとしたRACEをおこない、マウス「Tespec PRO-3」の全長cDNA配列

のクローニングをおこなった。

【0160】

マウス EST (AA497965, AA497934, AA497919, AA497949, AA271404, AA238183, AA240375, AA105229) の塩基配列を基に、5' RACE用プライマーとしてmPR03-B (配列番号: 42/5' CAC CTA CTG CCA GGA TCT GTG G 3') 及びmPR03-D (配列番号: 43/5' GGC TAT TTT CTC AAT CCA CAG GGT A 3') を、3' RACE用プライマーとしてmPR03-A (配列番号: 44/5' ATA GAG TGG GAG GAA TGC TTA CAG A 3') 及びmPR03-C (配列番号: 45/5' GCT ACG ATG CTT GCC AGG GTG 3') を作成し、mouse testis Marathon ready cDNA (CLONTECH) をテンプレートとして、添付マニュアルの方法に従いnested RACEを実施した。RACE産物を直接またはpGEM T easy vectorにサブクローニングしてその塩基配列を決定した。その塩基配列を配列番号: 7に、アミノ酸配列を配列番号: 8に示す。

【0161】

得られたマウス「Tespec PRO-3」のcDNAは1028塩基で、321アミノ酸をコードしていると思われる(図15)。予想されるアミノ酸配列は、「Trypsin-Ser」モチーフは持つが「Trypsin His」モチーフは6アミノ酸のコンセンサス[ LIVM ] - [ ST ] - A - [ STAG ] - H - Cから1アミノ酸異なる(LTVAHC)。しかしマウス「Tespec PRO-2」同様、既知のトリプシンファミリーセリンプロテアーゼにおいても、コンセンサス配列から数アミノ酸異なった配列を持つものも存在するため、得られたマウス「Tespec PRO-3」もプロテアーゼとして機能するものと考えられる。また、N末端にはシグナルペプチドと思われる疎水性領域が存在し、また分子内ジスルフィド結合をしていると思われるCys 残基も他のセリンプロテアーゼと比較してよく保存されていた。

【0162】

ヒト及びマウス「Tespec PRO-3」は、核酸及びアミノ酸レベルでそれぞれ70.2%、および59.6%の相同性を持つ(図16、17)。ヒト「Tespec PRO-3」に比べてマウス「Tespec PRO-3」は、核酸レベルにおいて5'側が約100塩基短く、またアミノ酸レベルにおいてもN末端側が約30アミノ酸短いことが判明した。

【0163】



【発明の効果】

本発明により、新規トリプシンファミリーセリンプロテアーゼおよびその遺伝子が提供された。本発明のタンパク質は、精子の分化・熟成または精子の機能（受精）に関与していることを示唆される。したがって、本発明のプロテアーゼやその遺伝子は、新しい不妊症の治療薬や不妊症診断薬の開発、あるいは新しい避妊薬の開発への利用が期待される。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.

<120> Trypsin family serine proteinases

<130> C2-006

<140>

<141>

<160> 45

<210> 1

<211> 1033

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (48)..(1010)

<400> 1

cctgcctcag tgttggagct cccattgct gatgtgcagg caagccg atg aaa cga 56

Met Lys Arg

1

tgg aag gac aga aga aca ggc ctg ttg ctg cca ttg gtc ctc ctg ttg 104

Trp Lys Asp Arg Arg Thr Gly Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu Leu

5

10

15

ttt ggg gca tgt agc tca ctg gca tgg gta tgt ggc cgg cga atg agt 152

Phe Gly Ala Cys Ser Ser Leu Ala Trp Val Cys Gly Arg Arg Met Ser

20

25

30

35

agc aga tcc caa caa ctt aac aat gct tct gct atc gtg gaa ggc aaa 200

Ser Arg Ser Gln Gln Leu Asn Asn Ala Ser Ala Ile Val Glu Gly Lys

40

45

50

cct gct tct gct atc gtg gga ggc aaa cct gca aac atc ttg gag ttc 248

Pro Ala Ser Ala Ile Val Gly Gly Lys Pro Ala Asn Ile Leu Glu Phe

55

60

65

ccc tgg cat gtg ggg att atg aat cat ggt agt cat ctc tgt ggg gga 296

Pro Trp His Val Gly Ile Met Asn His Gly Ser His Leu Cys Gly Gly

70

75

80

tct att ctc aat gag tgg tgg gtt cta tct gca tcc cat tgc ttc gac 344

Ser Ile Leu Asn Glu Trp Trp Val Leu Ser Ala Ser His Cys Phe Asp

85

90

95

caa cta aac aac tct aaa ttg gag atc att cat ggc act gaa gac ctc 392  
Gln Leu Asn Asn Ser Lys Leu Glu Ile Ile His Gly Thr Glu Asp Leu  
100 105 110 115

agc aca aag ggc ata aag tat cag aaa gtg gac aag tta ttc ttg cac 440  
Ser Thr Lys Gly Ile Lys Tyr Gln Lys Val Asp Lys Leu Phe Leu His  
120 125 130

cca aag ttt gat gac tgg ctc ctg gac aac gac ata gct ttg ctc ttg 488  
Pro Lys Phe Asp Asp Trp Leu Leu Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Leu  
135 140 145

ctc aaa tcc cca tta aac ttg agt gtc aac agg ata cct atc tgc act 536  
Leu Lys Ser Pro Leu Asn Leu Ser Val Asn Arg Ile Pro Ile Cys Thr  
150 155 160

tca gaa atc tct gac ata cag gca tgg agg aac tgc tgg gtg aca gga 584  
Ser Glu Ile Ser Asp Ile Gln Ala Trp Arg Asn Cys Trp Val Thr Gly  
165 170 175

tgg ggc att act aat act agt gaa aaa gga gtc caa ccc aca att ctg 632  
Trp Gly Ile Thr Asn Thr Ser Glu Lys Gly Val Gln Pro Thr Ile Leu  
180 185 190 195

cag gca gtc aaa gtg gat ctg tac aga tgg gat tgg tgt ggc tat att 680  
Gln Ala Val Lys Val Asp Leu Tyr Arg Trp Asp Trp Cys Gly Tyr Ile  
200 205 210

ttg tct cta tta acc aag aat atg ctg tgt gct ggg act caa gat cct 728  
 Leu Ser Leu Leu Thr Lys Asn Met Leu Cys Ala Gly Thr Gln Asp Pro  
 215 220 225

ggg aag gat gcc tgc cag ggc gac agt gga gga gct ctc gtt tgc aac 776  
 Gly Lys Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Cys Asn  
 230 235 240

aaa aag aga aac aca gcc att tgg tac cag gtg ggc att gtc agc tgg 824  
 Lys Lys Arg Asn Thr Ala Ile Trp Tyr Gln Val Gly Ile Val Ser Trp  
 245 250 255

ggc atg ggc tgt ggc aag aag aat ctg cca gga gta tac acc aag gtg 872  
 Gly Met Gly Cys Gly Lys Lys Asn Leu Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val  
 260 265 270 275

tca cac tat gtg agg tgg atc agc aag cag aca gcg aag gcg ggg agg 920  
 Ser His Tyr Val Arg Trp Ile Ser Lys Gln Thr Ala Lys Ala Gly Arg  
 280 285 290

cct tat atg tat gag cag aac tct gcg tgc cct ttg gtg ctc tct tgc 968  
 Pro Tyr Met Tyr Glu Gln Asn Ser Ala Cys Pro Leu Val Leu Ser Cys  
 295 300 305

cgg gct atc ttg ttc cta tat ttt gta atg ttt ctt cta acc tga 1013  
 Arg Ala Ile Leu Phe Leu Tyr Phe Val Met Phe Leu Leu Thr  
 310 315 320

tgattaaacg tgagactgcc 1033

<210> 2

<211> 321

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Lys Arg

1

Trp Lys Asp Arg Arg Thr Gly Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu Leu

5

10

15

Phe Gly Ala Cys Ser Ser Leu Ala Trp Val Cys Gly Arg Arg Met Ser

20

25

30

35

Ser Arg Ser Gln Gln Leu Asn Asn Ala Ser Ala Ile Val Glu Gly Lys

40

45

50

Pro Ala Ser Ala Ile Val Gly Gly Lys Pro Ala Asn Ile Leu Glu Phe

55

60

65

Pro Trp His Val Gly Ile Met Asn His Gly Ser His Leu Cys Gly Gly

70

75

80

Ser Ile Leu Asn Glu Trp Trp Val Leu Ser Ala Ser His Cys Phe Asp

85

90

95

Gln Leu Asn Asn Ser Lys Leu Glu Ile Ile His Gly Thr Glu Asp Leu

100	105	110	115
Ser Thr Lys Gly Ile Lys Tyr Gln Lys Val Asp Lys Leu Phe Leu His			
120	125	130	
Pro Lys Phe Asp Asp Trp Leu Leu Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Leu			
135	140	145	
Leu Lys Ser Pro Leu Asn Leu Ser Val Asn Arg Ile Pro Ile Cys Thr			
150	155	160	
Ser Glu Ile Ser Asp Ile Gln Ala Trp Arg Asn Cys Trp Val Thr Gly			
165	170	175	
Trp Gly Ile Thr Asn Thr Ser Glu Lys Gly Val Gln Pro Thr Ile Leu			
180	185	190	195
Gln Ala Val Lys Val Asp Leu Tyr Arg Trp Asp Trp Cys Gly Tyr Ile			
200	205	210	
Leu Ser Leu Leu Thr Lys Asn Met Leu Cys Ala Gly Thr Gln Asp Pro			
215	220	225	
Gly Lys Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Cys Asn			
230	235	240	
Lys Lys Arg Asn Thr Ala Ile Trp Tyr Gln Val Gly Ile Val Ser Trp			
245	250	255	

Gly Met Gly Cys Gly Lys Lys Asn Leu Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val  
260 265 270 275

Ser His Tyr Val Arg Trp Ile Ser Lys Gln Thr Ala Lys Ala Gly Arg  
280 285 290

Pro Tyr Met Tyr Glu Gln Asn Ser Ala Cys Pro Leu Val Leu Ser Cys  
295 300 305

Arg Ala Ile Leu Phe Leu Tyr Phe Val Met Phe Leu Leu Thr  
310 315 320

<210> 3

<211> 1034

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (69)..(1025)

<400> 3

cccacgcgtn cggttgatc aatgtgggca gggcatcaag gcaggcacca ctgcactgga 60

atgacaac atg atg ctc cca ctt cta att gca ctg ctc atg gct tcc aag 110

Met Met Leu Pro Leu Leu Ile Ala Leu Leu Met Ala Ser Lys

1

5

10

gga caa gct aag gac cag caa gaa tca gtt ctg tgt ggc cac aga cct 158

15                      20                      25                      30

Ala Phe Pro Asn Ser Ser Trp Leu Pro Leu Arg Glu Leu Leu Glu Val

35                      40                      45

Gln His Gly Glu Phe Pro Trp Gln Val Ser Ile Gln Met Leu Gly Lys

**50                      55                      60**

His Leu Cys Gly Gly Ser Ile Ile His Arg Trp Trp Val Leu Thr Ala

65                      70                      75

Ala His Cys Phe Pro Arg Thr Leu Leu Glu Leu Val Ala Val Asn Val

80 85 90

Thr Val Val Met Gly Ile Lys Thr Phe Ser Asp Thr Asn Leu Glu Arg

95                      100                      105                      110

Lys Gln Val Gln Lys Ile Ile Ala His Arg Asp Tyr Lys Pro Pro Asp

115                      120                      125

Leu Asp Ser Asp Leu Cys Leu Leu Leu Leu Ala Thr Pro Ile Gln Phe



130	135	140	
aat aaa gac aaa atg ccc atc tgc ctg cca cag agg gag aac tcc tgg			542
Asn Lys Asp Lys Met Pro Ile Cys Leu Pro Gln Arg Glu Asn Ser Trp			
145	150	155	
gac cgg tgc tgg atg tca gag tgg gca tat act cat ggc cat ggt tca			590
Asp Arg Cys Trp Met Ser Glu Trp Ala Tyr Thr His Gly His Gly Ser			
160	165	170	
gcc aaa ggc tca aac atg cac ctg aag aag ctc agg gtg gtt cag att			638
Ala Lys Gly Ser Asn Met His Leu Lys Lys Leu Arg Val Val Gln Ile			
175	180	185	190
agc tgg agg aca tgt gcg aag agg gtg act cag ctc tcc agg aac atg			686
Ser Trp Arg Thr Cys Ala Lys Arg Val Thr Gln Leu Ser Arg Asn Met			
195	200	205	
ctt tgt gct tgg aag gaa gtg ggc acc aac ggc aag tgc cag gga gac			734
Leu Cys Ala Trp Lys Glu Val Gly Thr Asn Gly Lys Cys Gln Gly Asp			
210	215	220	
agc ggg gca ccc atg gtc tgt gct aac tgg gag act cgg aga ctc ttt			782
Ser Gly Ala Pro Met Val Cys Ala Asn Trp Glu Thr Arg Arg Leu Phe			
225	230	235	
caa gtg ggt gtc ttc agc tgg ggc ata act tca gga tcc agg ggg agg			830
Gln Val Gly Val Phe Ser Trp Gly Ile Thr Ser Gly Ser Arg Gly Arg			
240	245	250	

cca ggc att ttt gtg tct gtg gct cag ttt atc cca tgg atc ctg gag 878  
 Pro Gly Ile Phe Val Ser Val Ala Gln Phe Ile Pro Trp Ile Leu Glu  
 255 260 265 270

gag aca caa agg gag gga cga gcc ctt gcc ctc tca aag gcc tca aaa 926  
 Glu Thr Gln Arg Glu Gly Arg Ala Leu Ala Leu Ser Lys Ala Ser Lys  
 275 280 285

agt ctc ttg gct ggc agt cca cgc tac cat ccc ata ttg cta agc atg 974  
 Ser Leu Leu Ala Gly Ser Pro Arg Tyr His Pro Ile Leu Leu Ser Met  
 290 295 300

ggc tct caa ata ctg ctt gct gcc ata ttt tct gat gat aaa tca aat 1022  
 Gly Ser Gln Ile Leu Leu Ala Ala Ile Phe Ser Asp Asp Lys Ser Asn  
 305 310 315

tgc taa gctctg 1034  
 Cys

<210> 4

<211> 319

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Met Leu Pro Leu Leu Ile Ala Leu Leu Met Ala Ser Lys

1

5

10

Gly Gln Ala Lys Asp Gln Gln Glu Ser Val Leu Cys Gly His Arg Pro  
15 20 25 30

Ala Phe Pro Asn Ser Ser Trp Leu Pro Leu Arg Glu Leu Leu Glu Val  
35 40 45

Gln His Gly Glu Phe Pro Trp Gln Val Ser Ile Gln Met Leu Gly Lys  
50 55 60

His Leu Cys Gly Gly Ser Ile Ile His Arg Trp Trp Val Leu Thr Ala  
65 70 75

Ala His Cys Phe Pro Arg Thr Leu Leu Glu Leu Val Ala Val Asn Val  
80 85 90

Thr Val Val Met Gly Ile Lys Thr Phe Ser Asp Thr Asn Leu Glu Arg  
95 100 105 110

Lys Gln Val Gln Lys Ile Ile Ala His Arg Asp Tyr Lys Pro Pro Asp  
115 120 125

Leu Asp Ser Asp Leu Cys Leu Leu Leu Leu Ala Thr Pro Ile Gln Phe  
130 135 140

Asn Lys Asp Lys Met Pro Ile Cys Leu Pro Gln Arg Glu Asn Ser Trp  
145 150 155

Asp Arg Cys Trp Met Ser Glu Trp Ala Tyr Thr His Gly His Gly Ser

160	165	170	
Ala Lys Gly Ser Asn Met His Leu Lys Lys Leu Arg Val Val Gln Ile			
175	180	185	190
Ser Trp Arg Thr Cys Ala Lys Arg Val Thr Gln Leu Ser Arg Asn Met			
	195	200	205
Leu Cys Ala Trp Lys Glu Val Gly Thr Asn Gly Lys Cys Gln Gly Asp			
	210	215	220
Ser Gly Ala Pro Met Val Cys Ala Asn Trp Glu Thr Arg Arg Leu Phe			
	225	230	235
Gln Val Gly Val Phe Ser Trp Gly Ile Thr Ser Gly Ser Arg Gly Arg			
	240	245	250
Pro Gly Ile Phe Val Ser Val Ala Gln Phe Ile Pro Trp Ile Leu Glu			
	255	260	265
			270
Glu Thr Gln Arg Glu Gly Arg Ala Leu Ala Leu Ser Lys Ala Ser Lys			
	275	280	285
Ser Leu Leu Ala Gly Ser Pro Arg Tyr His Pro Ile Leu Leu Ser Met			
	290	295	300
Gly Ser Gln Ile Leu Leu Ala Ala Ile Phe Ser Asp Asp Lys Ser Asn			
	305	310	315

Cys

<210> 5

<211> 1035

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (73)..(867)

<400> 5

ctgtggctgg catgttgcca gctctggctg gaggcaaagg ttggcaatt ttggactgga 60

attgacaaga ag atg ttc cag ctt cta att ccc ctg ctt ttg gca ctc aag 111

Met Phe Gln Leu Leu Ile Pro Leu Leu Leu Ala Leu Lys

1

5

10

gga cat gcc cag gac aat cca gaa aac gta caa tgt ggc cac agg cct 159

Gly His Ala Gln Asp Asn Pro Glu Asn Val Gln Cys Gly His Arg Pro

15

20

25

gct ttt cca aac tcg tca tgg tta cca ttt cat gaa cgg ctt caa gtc 207

Ala Phe Pro Asn Ser Ser Trp Leu Pro Phe His Glu Arg Leu Gln Val

30

35

40

45

cag aat ggt gag tgc ccg tgg caa gtg agt atc cag atg tca cgg aaa 255

Gln Asn Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Ser Ile Gln Met Ser Arg Lys

50	55	60	
cac ctc tgt gga ggc tca atc tta cat tgg tgg tgg gtt ctg aca gcc			303
His Leu Cys Gly Gly Ser Ile Leu His Trp Trp Trp Val Leu Thr Ala			
65	70	75	
gca cac tgc ttc cga aga acc cta tta gac atg gcc gtg gta aat gtc			351
Ala His Cys Phe Arg Arg Thr Leu Leu Asp Met Ala Val Val Asn Val			
80	85	90	
act gtg gtc atg gga acg aga aca ttc agc aac atc cac tcg gag aga			399
Thr Val Val Met Gly Thr Arg Thr Phe Ser Asn Ile His Ser Glu Arg			
95	100	105	
aag caa gtg cag aag gtc att att cac aaa gat tac aaa ccg ccc cag			447
Lys Gln Val Gln Lys Val Ile Ile His Lys Asp Tyr Lys Pro Pro Gln			
110	115	120	125
ctc gac agt gac ctc tct ctg ctt cta ctt gcc aca cca gtg caa ttc			495
Leu Asp Ser Asp Leu Ser Leu Leu Leu Leu Ala Thr Pro Val Gln Phe			
130	135	140	
agc aat ttc aaa atg cct gtc tgc ctg cag gag gag gag agg acc tgg			543
Ser Asn Phe Lys Met Pro Val Cys Leu Gln Glu Glu Glu Arg Thr Trp			
145	150	155	
gac tgg tgt tgg atg gca cag tgg gta acg acc aat ggg tat gac caa			591
Asp Trp Cys Trp Met Ala Gln Trp Val Thr Thr Asn Gly Tyr Asp Gln			
160	165	170	

tat gat gac tta aac atg cac ctg gaa aag ctg aga gtg gtg cag att	639
Tyr Asp Asp Leu Asn Met His Leu Glu Lys Leu Arg Val Val Gln Ile	
175                                      180                                      185	
agc cgg aaa gaa tgt gcc aag agg gta aac cag ctg tcc agg aac atg	687
Ser Arg Lys Glu Cys Ala Lys Arg Val Asn Gln Leu Ser Arg Asn Met	
190                                      195                                      200                                      205	
att tgt gct tgc aac gaa cca ggc acc aat ggt atc ttc aag gga gac	735
Ile Cys Ala Ser Asn Glu Pro Gly Thr Asn Gly Ile Phe Lys Gly Asp	
210                                      215                                      220	
agt ggg gca cct ctg gtt tgt gct att tat gga acc cag aga ctc ttc	783
Ser Gly Ala Pro Leu Val Cys Ala Ile Tyr Gly Thr Gln Arg Leu Phe	
225                                      230                                      235	
caa gtg ggt gtc ttc agt ggg ggc ata aga tct ggc tcc agg ggg aga	831
Gln Val Gly Val Phe Ser Gly Gly Ile Arg Ser Gly Ser Arg Gly Arg	
240                                      245                                      250	
cct ggt atg ttt gtg tct gtg gct caa ttt att cca tga agccaggagg	880
Pro Gly Met Phe Val Ser Val Ala Gln Phe Ile Pro	
255                                      260                                      265	
agacagaaaa ggaggggaaa gcctacacca taatctcagg atccacgaga agccgagaag	940
ctcactgggtg tgtgttcctc agtaccctt cttgctagga ttggggtctc aaatgctgct	1000

ggccaccatg tttaccggtg ataaacctaa cyrcw

1035

<210> 6

<211> 265

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Phe Gln Leu Leu Ile Pro Leu Leu Leu Ala Leu Lys

1 5 10

Gly His Ala Gln Asp Asn Pro Glu Asn Val Gln Cys Gly His Arg Pro

15 20 25

Ala Phe Pro Asn Ser Ser Trp Leu Pro Phe His Glu Arg Leu Gln Val

30 35 40 45

Gln Asn Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Ser Ile Gln Met Ser Arg Lys

50 55 60

His Leu Cys Gly Gly Ser Ile Leu His Trp Trp Trp Val Leu Thr Ala

65 70 75

Ala His Cys Phe Arg Arg Thr Leu Leu Asp Met Ala Val Val Asn Val

80 85 90

Thr Val Val Met Gly Thr Arg Thr Phe Ser Asn Ile His Ser Glu Arg

95 100 105



Lys Gln Val Gln Lys Val Ile Ile His Lys Asp Tyr Lys Pro Pro Gln  
110 115 120 125

Leu Asp Ser Asp Leu Ser Leu Leu Leu Leu Ala Thr Pro Val Gln Phe  
130 135 140

Ser Asn Phe Lys Met Pro Val Cys Leu Gln Glu Glu Glu Arg Thr Trp  
145 150 155

Asp Trp Cys Trp Met Ala Gln Trp Val Thr Thr Asn Gly Tyr Asp Gln  
160 165 170

Tyr Asp Asp Leu Asn Met His Leu Glu Lys Leu Arg Val Val Gln Ile  
175 180 185

Ser Arg Lys Glu Cys Ala Lys Arg Val Asn Gln Leu Ser Arg Asn Met  
190 195 200 205

Ile Cys Ala Ser Asn Glu Pro Gly Thr Asn Gly Ile Phe Lys Gly Asp  
210 215 220

Ser Gly Ala Pro Leu Val Cys Ala Ile Tyr Gly Thr Gln Arg Leu Phe  
225 230 235

Gln Val Gly Val Phe Ser Gly Gly Ile Arg Ser Gly Ser Arg Gly Arg  
240 245 250

Pro Gly Met Phe Val Ser Val Ala Gln Phe Ile Pro  
255 260 265

<210> 7  
<211> 1028  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (38)..(1000)

<400> 7

gtcagcctgg cctccaacac acagcacagc cagagcc atg atc ctg ccc tcc atc 55  
Met Ile Leu Pro Ser Ile  
1 5

ctg cta ctt gtt gcc cac acc ctg gaa gca aat gtt gag tgt ggt gtg 103  
Leu Leu Leu Val Ala His Thr Leu Glu Ala Asn Val Glu Cys Gly Val  
10 15 20

aga ccc ctg tat gat agc aga att caa tac tcc agg atc ata gaa ggg 151  
Arg Pro Leu Tyr Asp Ser Arg Ile Gln Tyr Ser Arg Ile Ile Glu Gly  
25 30 35

cag gag gct gag ctg ggt gag ttt cca tgg cag gtg agc att cag gaa 199  
Gln Glu Ala Glu Leu Gly Glu Phe Pro Trp Gln Val Ser Ile Gln Glu  
40 45 50

agt gac cac cat ttc tgc ggc ggc tcc att ctc agt gag tgg tgg atc 247  
Ser Asp His His Phe Cys Gly Gly Ser Ile Leu Ser Glu Trp Trp Ile

55	60	65	70	
ctc acc gtg gcc cac tgc ttc tat gct cag gag ctt tcc cca aca gat				295
Leu Thr Val Ala His Cys Phe Tyr Ala Gln Glu Leu Ser Pro Thr Asp				
	75	80	85	
ctc aga gtc aga gtg gga acc aat gac tta act act tca ccc gtg gaa				343
Leu Arg Val Arg Val Gly Thr Asn Asp Leu Thr Thr Ser Pro Val Glu				
	90	95	100	
cta gag gtc acc acc ata atc cgg cac aaa ggc ttt aaa cgg ctg aac				391
Leu Glu Val Thr Thr Ile Ile Arg His Lys Gly Phe Lys Arg Leu Asn				
	105	110	115	
atg gac aac gac att gcc ttg ttg ctg cta gcc aag ccc ttg gcg ttc				439
Met Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Leu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Phe				
	120	125	130	
aat gag ctg acg gtg ccc atc tgc ctt cct ctc tgg ccc gcc cct ccc				487
Asn Glu Leu Thr Val Pro Ile Cys Leu Pro Leu Trp Pro Ala Pro Pro				
	135	140	145	150
agc tgg cac gaa tgc tgg gtg gca gga tgg ggc gta acc aac tca act				535
Ser Trp His Glu Cys Trp Val Ala Gly Trp Gly Val Thr Asn Ser Thr				
	155	160	165	
gac aag gaa tct atg tca acg gat ctg atg aag gtg ccc atg cgt atc				583
Asp Lys Glu Ser Met Ser Thr Asp Leu Met Lys Val Pro Met Arg Ile				
	170	175	180	

ata gag tgg gag gaa tgc tta cag atg ttt ccc agc ctc acc aca aac	631
Ile Glu Trp Glu Glu Cys Leu Gln Met Phe Pro Ser Leu Thr Thr Asn	
185 190 195	
atg ctg tgt gcc tca tat ggt aat gag agc tac gat gct tgc cag ggt	679
Met Leu Cys Ala Ser Tyr Gly Asn Glu Ser Tyr Asp Ala Cys Gln Gly	
200 205 210	
gac agt ggg gga ccg ctt gtc tgc acc aca gat cct ggc agt agg tgg	727
Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Thr Thr Asp Pro Gly Ser Arg Trp	
215 220 225 230	
tac cag gtg ggc atc atc agc tgg ggc aag agc tgt gga aaa aaa ggc	775
Tyr Gln Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Lys Ser Cys Gly Lys Lys Gly	
235 240 245	
ttc cca ggg ata tat act gta ttg gca aag tat acc ctg tgg att gag	823
Phe Pro Gly Ile Tyr Thr Val Leu Ala Lys Tyr Thr Leu Trp Ile Glu	
250 255 260	
aaa ata gcc cag aca gag ggg aag ccc ctg gat ttt aga ggt cag agc	871
Lys Ile Ala Gln Thr Glu Gly Lys Pro Leu Asp Phe Arg Gly Gln Ser	
265 270 275	
tcc tct aac aag aag aaa aac aga cag aac aat cag ctc tcc aaa tcc	919
Ser Ser Asn Lys Lys Lys Asn Arg Gln Asn Asn Gln Leu Ser Lys Ser	
280 285 290	

cca gcc ctg aac tgc ccc caa agc tgg ctc ctg ccc tgt ctg ctg tcc 967  
 Pro Ala Leu Asn Cys Pro Gln Ser Trp Leu Leu Pro Cys Leu Leu Ser  
 295 300 305 310

ttt gca ctg ctt aga gcc ttg tcc aac tgg aaa taaaacaatg cagtctctga 1020  
 Phe Ala Leu Leu Arg Ala Leu Ser Asn Trp Lys  
 315 320

tccaccct 1028

<210> 8

<211> 321

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Met Ile Leu Pro Ser Ile

1 5

Leu Leu Leu Val Ala His Thr Leu Glu Ala Asn Val Glu Cys Gly Val  
 10 15 20

Arg Pro Leu Tyr Asp Ser Arg Ile Gln Tyr Ser Arg Ile Ile Glu Gly  
 25 30 35

Gln Glu Ala Glu Leu Gly Glu Phe Pro Trp Gln Val Ser Ile Gln Glu  
 40 45 50

Ser Asp His His Phe Cys Gly Gly Ser Ile Leu Ser Glu Trp Trp Ile

55                                  60                                  65                                  70

Leu Thr Val Ala His Cys Phe Tyr Ala Gln Glu Leu Ser Pro Thr Asp

75                                  80                                  85

Leu Arg Val Arg Val Gly Thr Asn Asp Leu Thr Thr Ser Pro Val Glu

90                                  95                                  100

Leu Glu Val Thr Thr Ile Ile Arg His Lys Gly Phe Lys Arg Leu Asn

105                                  110                                  115

Met Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Leu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Phe

120                                  125                                  130

Asn Glu Leu Thr Val Pro Ile Cys Leu Pro Leu Trp Pro Ala Pro Pro

135                                  140                                  145                                  150

Ser Trp His Glu Cys Trp Val Ala Gly Trp Gly Val Thr Asn Ser Thr

155                                  160                                  165

Asp Lys Glu Ser Met Ser Thr Asp Leu Met Lys Val Pro Met Arg Ile

170                                  175                                  180

Ile Glu Trp Glu Glu Cys Leu Gln Met Phe Pro Ser Leu Thr Thr Asn

185                                  190                                  195

Met Leu Cys Ala Ser Tyr Gly Asn Glu Ser Tyr Asp Ala Cys Gln Gly

200                                  205                                  210

Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Thr Thr Asp Pro Gly Ser Arg Trp  
215 220 225 230

Tyr Gln Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Lys Ser Cys Gly Lys Lys Gly  
235 240 245

Phe Pro Gly Ile Tyr Thr Val Leu Ala Lys Tyr Thr Leu Trp Ile Glu  
250 255 260

Lys Ile Ala Gln Thr Glu Gly Lys Pro Leu Asp Phe Arg Gly Gln Ser  
265 270 275

Ser Ser Asn Lys Lys Lys Asn Arg Gln Asn Asn Gln Leu Ser Lys Ser  
280 285 290

Pro Ala Leu Asn Cys Pro Gln Ser Trp Leu Leu Pro Cys Leu Leu Ser  
295 300 305 310

Phe Ala Leu Leu Arg Ala Leu Ser Asn Trp Lys  
315 320

<210> 9

<211> 1123

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (41)..(1096)

<400> 9

ggcctctgtc acccccgggc ccacagcaca gcccagggcc atg ctc ctg ttc tca	55
Met Leu Leu Phe Ser	
1 5	
gtg ttg ctg ctc ctg tcc ctg gtc acg gga act cag ctc ggt cca cgg	103
Val Leu Leu Leu Leu Ser Leu Val Thr Gly Thr Gln Leu Gly Pro Arg	
10 15 20	
act cct ctc cca gag gct gga gtg gct atc cta ggc agg gct agg gga	151
Thr Pro Leu Pro Glu Ala Gly Val Ala Ile Leu Gly Arg Ala Arg Gly	
25 30 35	
gcc cac cgc cct cag ccc cgt cat ccc ccc agc cca gtc agt gaa tgt	199
Ala His Arg Pro Gln Pro Arg His Pro Pro Ser Pro Val Ser Glu Cys	
40 45 50	
ggt gac aga tct att ttc gag gga aga act cgg tat tcc aga atc aca	247
Gly Asp Arg Ser Ile Phe Glu Gly Arg Thr Arg Tyr Ser Arg Ile Thr	
55 60 65	
ggg ggg atg gag gcg gag gtg ggt gag ttt ccg tgg cag gtg agt att	295
Gly Gly Met Glu Ala Glu Val Gly Glu Phe Pro Trp Gln Val Ser Ile	
70 75 80 85	
cag gca aga agt gaa cct ttc tgt ggc ggc tcc atc ctc aac aag tgg	343
Gln Ala Arg Ser Glu Pro Phe Cys Gly Gly Ser Ile Leu Asn Lys Trp	



90	95	100	
tgg att ctc act gcg gct cac tgc tta tat tcc gag gag ctg ttt cca			391
Trp Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Ser Glu Glu Leu Phe Pro			
105	110	115	
gaa gaa ctg agt gtc gtg ctg ggg acc aac gac tta act agc cca tcc			439
Glu Glu Leu Ser Val Val Leu Gly Thr Asn Asp Leu Thr Ser Pro Ser			
120	125	130	
atg gaa ata aag gag gtc gcc agc atc att ctt cac aaa gac ttt aag			487
Met Glu Ile Lys Glu Val Ala Ser Ile Ile Leu His Lys Asp Phe Lys			
135	140	145	
aga gcc aac atg gac aat gac att gcc ttg ctg ctg ctg gct tgc ccc			535
Arg Ala Asn Met Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ser Pro			
150	155	160	165
atc aag ctc gat gac ctg aag gtg ccc atc tgc ctc ccc acg cag ccc			583
Ile Lys Leu Asp Asp Leu Lys Val Pro Ile Cys Leu Pro Thr Gln Pro			
170	175	180	
ggc cct gcc aca tgg cgc gaa tgc tgg gtg gca ggt tgg ggc cag acc			631
Gly Pro Ala Thr Trp Arg Glu Cys Trp Val Ala Gly Trp Gly Gln Thr			
185	190	195	
aat gct gct gac aaa aac tct gtg aaa acg gat ctg atg aaa gcg cca			679
Asn Ala Ala Asp Lys Asn Ser Val Lys Thr Asp Leu Met Lys Ala Pro			
200	205	210	

atg gtc atc atg gac tgg gag gag tgt tca aag atg ttt cca aaa ctt 727  
Met Val Ile Met Asp Trp Glu Glu Cys Ser Lys Met Phe Pro Lys Leu

acc aaa aat atg ctg tgt gcc gga tac aag aat gag agc tat gat gcc 775  
Thr Lys Asn Met Leu Cys Ala Gly Tyr Lys Asn Glu Ser Tyr Asp Ala  
230 235 240 245

tgc aag ggt gac agt ggg ggg cct ctg gtc tgc acc cca gag cct ggt 823  
Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Thr Pro Glu Pro Gly  
250 255 260

gag aag tgg tac cag gtg ggc atc atc agc tgg gga aag agc tgt gga 871  
Glu Lys Trp Tyr Gln Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Lys Ser Cys Gly  
265 270 275

gat aag aac acc cca ggg ata tac acc tcg ttg gtg aac tac aac ctc 919  
Asp Lys Asn Thr Pro Gly Ile Tyr Thr Ser Leu Val Asn Tyr Asn Leu  
280 285 290

tgg atc gag aaa gtg acc cag cta gga ggc agg ccc ttc aat gca gag 967  
Trp Ile Glu Lys Val Thr Gln Leu Gly Gly Arg Pro Phe Asn Ala Glu  
295 300 305

aaa agg agg act tct gtc aaa cag aaa cct atg ggc tcc cca gtc tcg 1015  
Lys Arg Arg Thr Ser Val Lys Gln Lys Pro Met Gly Ser Pro Val Ser  
310 315 320 325

gga gtc cca gag cca ggc agc ccc aga tcc tgg ctc ctg ctc tgt ccc 1063

Gly Val Pro Glu Pro Gly Ser Pro Arg Ser Trp Leu Leu Leu Cys Pro

330

335

340

ctg tcc cat gtg ttg ttc aga gct att ttg tac tgataataaa atagaggcta 1116

Leu Ser His Val Leu Phe Arg Ala Ile Leu Tyr

345

350

ttctttc

1123

<210> 10

<211> 352

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Leu Leu Phe Ser

1

5

Val Leu Leu Leu Leu Ser Leu Val Thr Gly Thr Gln Leu Gly Pro Arg

10

15

20

Thr Pro Leu Pro Glu Ala Gly Val Ala Ile Leu Gly Arg Ala Arg Gly

25

30

35

Ala His Arg Pro Gln Pro Arg His Pro Pro Ser Pro Val Ser Glu Cys

40

45

50

Gly Asp Arg Ser Ile Phe Glu Gly Arg Thr Arg Tyr Ser Arg Ile Thr

55	60	65
Gly Gly Met Glu Ala Glu Val Gly Glu Phe Pro Trp Gln Val Ser Ile		
70	75	80 85
Gln Ala Arg Ser Glu Pro Phe Cys Gly Gly Ser Ile Leu Asn Lys Trp		
90	95	100
Trp Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Ser Glu Glu Leu Phe Pro		
105	110	115
Glu Glu Leu Ser Val Val Leu Gly Thr Asn Asp Leu Thr Ser Pro Ser		
120	125	130
Met Glu Ile Lys Glu Val Ala Ser Ile Ile Leu His Lys Asp Phe Lys		
135	140	145
Arg Ala Asn Met Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ser Pro		
150	155	160 165
Ile Lys Leu Asp Asp Leu Lys Val Pro Ile Cys Leu Pro Thr Gln Pro		
170	175	180
Gly Pro Ala Thr Trp Arg Glu Cys Trp Val Ala Gly Trp Gly Gln Thr		
185	190	195
Asn Ala Ala Asp Lys Asn Ser Val Lys Thr Asp Leu Met Lys Ala Pro		
200	205	210

Met Val Ile Met Asp Trp Glu Glu Cys Ser Lys Met Phe Pro Lys Leu  
215 220 225

Thr Lys Asn Met Leu Cys Ala Gly Tyr Lys Asn Glu Ser Tyr Asp Ala  
230 235 240 245

Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Thr Pro Glu Pro Gly  
250 255 260

Glu Lys Trp Tyr Gln Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Lys Ser Cys Gly  
265 270 275

Asp Lys Asn Thr Pro Gly Ile Tyr Thr Ser Leu Val Asn Tyr Asn Leu  
280 285 290

Trp Ile Glu Lys Val Thr Gln Leu Gly Gly Arg Pro Phe Asn Ala Glu  
295 300 305

Lys Arg Arg Thr Ser Val Lys Gln Lys Pro Met Gly Ser Pro Val Ser  
310 315 320 325

Gly Val Pro Glu Pro Gly Ser Pro Arg Ser Trp Leu Leu Leu Cys Pro  
330 335 340

Leu Ser His Val Leu Phe Arg Ala Ile Leu Tyr  
345 350

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "76A5sc2-B",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 11

gacmacagg tgccagtcac ca

22

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "SPORT SP6",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 12

atttaggtga cactatagaa

20

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "SPORT FW",

an artificially synthesized primer sequence.

<400> 13

tgtaaaacga cggccagt

18

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "SPORT RV",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 14

caggaaacag ctatgacc

18

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "No9-C",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 15

atgcttctgc tatcgtggaa gg

22

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "SPORT T7",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 16

taatacgact cactataggg

20

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "No9-B",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 17

ctttgtgctg aggtcttcag tg

22

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "No9-G",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 18

cagtcaatgt cactgtggtc at

22

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "No9-J",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 19

acttgccggtt ggtgcccact tc

22

<210> 20

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "No9-P",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 20

gcactggaat gacaacatga tgc

23

<210> 21

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "No9-Q",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 21

attggcgtgg caagtaggag ca

22

<210> 22

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "No9-N",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 22

cgagtcctccc agttagcaca ga

22

<210> 23

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "No9-M' ",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 23

cggtgacttg gtcattgtctg tg

22

<210> 24

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "No9-K",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 24

ggatccatga aacgatggaa ggacagaag

29

<210> 25

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "No9-O",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 25

cgcagagttc tgctcataca ta

22

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "No9-A",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 26

ggcatgtagc tcactggcat g

21

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "29(-)",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 27

ggaccagcaa gaatcagttc tg

22

<210> 28

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "17(+)95(+)",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 28

ctgctaccag ttctaatttg cc

22

<210> 29

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "G3PDH 5' ",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 29

gagattgttg ccatcaacga cc

22

<210> 30

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "G3PDH 3' ",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 30

gttgaagtcg caggagacaa cc

22

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "h-B",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 31

agaggtcact gtcgagctgg g

21

<210> 32

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "h-D",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 32

tgtgaataat gaccttctgc ac

22

<210> 33

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "h-A",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 33

ttcagcaaca tccactcgga ga

22

<210> 34

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "h-C",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 34

aagcaagtgc agaaggtcat ta

22

<210> 35

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "h-F",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 35

cattggtcgt tacccactgt gc

22

<210> 36

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "PR01-E",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 36

attctcaatg agtggtgggt tct

23

<210> 37

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "PR01-D",  
an artificially synthesized primer sequence.



<400> 37

ccagcacaca gcatattcctt gg

22

<210> 38

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "hPR03-B",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 38

ggaaacagct cctcggaata taagc

25

<210> 39

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "hPR03-D",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 39

tggatgggct agttaagtcg ttggt

25

<210> 40

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "hPRO3-A",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 40

ttcgaggga gaactcggta ttc

23

<210> 41

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "hPRO3-C",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 41

tgtgaaaacg gatctgatga aagcg

25

<210> 42

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "mPRO3-B",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 42

cacctactgc caggatctgt gg

22

<210> 43

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "mPRO3-D",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 43

ggctattttc tcaatccaca gggta

25

<210> 44

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "mPRO3-A",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 44

atagagtggg aggaatgctt acaga

25

<210> 45

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "mPR03-C",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 45

gctacgatgc ttgccagggt g

21

# 【図面の簡単な説明】

## 【図 1】

マウス「Tespac PRO-1」のcDNA配列およびアミノ酸配列を示す図である。トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ活性部位を下線で示した。また、ポリAシグナルを波線で示した。

## 【図 2】

マウス「Tespac PRO-2」のcDNA配列およびアミノ酸配列を示す図である。トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ活性部位を下線で示した。また、ポリAシグナルを波線で示した。

## 【図 3】

マウス「Tespac PRO-1」、「Tespac PRO-2」および既知のプロテアーゼのアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。全てで一致するアミノ酸は「\*」で、類似するアミノ酸は「・」で表した。またトリプシンファミリーセリンプロテアーゼ活性部位を枠で囲んで示した。

## 【図 4】

マウス精巣のRT-PCRによる「Tespec PRO-1」、「Tespec PRO-2」 cDNAの増幅結果を表す図である。上段に使用したプライマーの位置を、下段にRT-PCRによる増幅産物の電気泳動写真を示す。

【図5】

マウス「Tespec PRO-1」、「Tespec PRO-2」およびそれらのスプライシングアイソフォームの構造を表す模式図である。長方形の下に数字は塩基数を示す。

【図6】

RT-PCRによるマウス「Tespec PRO-1」、「Tespec PRO-2」の組織での発現を表す図である。上段に使用したプライマーの位置を、下段にRT-PCRによる増幅産物の電気泳動写真を示す。1；肝臓、2；脳、3；胸腺、4；心臓、5；肺、6；脾臓、7；精巣、8；卵巣、9；腎臓、10；10～11日目胎児、11；蒸留水（対照）。

【図7】

ノーザンブロットによるマウス「Tespec PRO-1」、「Tespec PRO-2」の組織での発現を表す図である。上段に使用したプローブの位置を、下段にノーザンブロットの結果を示す。1；7日胚、2；11日胚、3；15日胚、4；17日胚、5；心臓、6；脳、7；脾臓、8；肺、9；肝臓、10；骨格筋、11；腎臓、12；精巣。

【図8】

RT-PCR解析によるマウス「Tespec PRO-1」、「Tespec PRO-2」の精巣での発現時期を示す図である。1；W/Wv No.1 精巣、2；W/Wv No.2 精巣、3；W/Wv No.3 精巣、4；生後4日 精巣、5；生後8日 精巣、6；生後12日 精巣、7；生後18日 精巣、8；生後42日 精巣、9；成体 精巣、10；成体 肝臓、11；蒸留水（対照）。

【図9】

ヒト「Tespec PRO-2」のcDNA配列およびアミノ酸配列を示す図である。トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ活性部位を下線で示した。また、ポリAシグナルを波線で示した。

【図10】

マウスおよびヒト「Tespec PRO-2」の塩基配列の比較を示す図である。2つで一致する塩基は枠で囲んだ。

【図 1 1】

マウスおよびヒト「Tespec PRO-2」のアミノ酸配列の比較を示す図である。2つで一致するアミノ酸は「\*」で、類似するアミノ酸は「・」で示した。また、トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ活性部位を枠で囲んだ。

【図 1 2】

ヒト「Tespec PRO-2」の染色体マッピングのためのPCRの結果を示す図である。

【図 1 3】

ヒト「Tespec PRO-3」のcDNA配列およびアミノ酸配列を示す図である。トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ活性部位を下線で示した。また、ポリAシグナルを波線で示した。

【図 1 4】

「Tespec PRO-1」および「Tespec PRO-3」の塩基配列の相同性の比較を表す図である。なお、塩基配列の相同性は、マウス「Tespec PRO-1」においては全長塩基配列、マウス「Tespec PRO-3」においては約400bpのEST領域、ヒト「Tespec PRO-3」においては実施例 9 に記載の低ストリンジェンシーRT-PCRで取得した約200bpの領域を比較した。

【図 1 5】

マウス「Tespec PRO-3」のcDNA配列およびアミノ酸配列を示す図である。トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ活性部位を下線で示した。また、ポリAシグナルを波線で示した。

【図 1 6】

マウス「Tespec PRO-3」(m. Tespec PRO-3) およびヒト「Tespec PRO-3」(h. Tespec PRO-3) の塩基配列の比較を示す図である。2つで一致する塩基は枠で囲んだ。

【図 1 7】

マウス「Tespec PRO-3」(m. Tespec PRO-3) およびヒト「Tespec PRO-3」(h

・ Tespec PR0-3) のアミノ酸配列の比較を示す図である。2つで一致するアミノ酸残基は枠で囲んだ。

【書類名】 図面

【図 1】

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90
CCTGCTCAGTGTGGAAGCTCCCATTTGCTGATGTGCAAGGCAAGCCGATGAAACGATGGAAGGACAGAAAGACAGGCTGTTGCTGCCAT
M K R W K D R R T G L L L P L

100     110     120     130     140     150     160     170     180
TGGTCCTCCTGTTGTTTGGGGCATGTAGCTCACTGGCATGGGTATGTGGCCGGCGAATGAATAGCAGATCCCAACAACCTTAACAATGCTT
V L L L F G A C S S L A W V C G R R M S S R S Q Q L N N A S

190     200     210     220     230     240     250     260     270
CTGCTATCGTGGAAAGGCAACCTGCTTCTGCTATCGTGGGAGGCAACCTGCAACATCTTGGAGTTCCCTGGCATGTGGGGATTATGA
A I V E G K P A S A I V G G K P A N I L E F P W H V G I M N

280     290     300     310     320     330     340     350     360
ATCATGGTATGTCATCTCTGTGGGGGATCTATTCTCAATGAGTGGTGGGTTCTATCTGTCATCCCATTTGCTTGGACCAACTAAACAACCTCTA
H G S H L C G G S I L N E W W V L S A S H C F D Q L N N S K

370     380     390     400     410     420     430     440     450
AATTGGAGATCATTGATGGGCACTGAAAGACCTCAGCACAAGGGGCAAAAGTATCAGAAAGTGGACAAGTTATTTGTCACCCAAAGTTTG
L E I I H G T E D L S T K G I K Y Q K V D K L F L H P K F D

460     470     480     490     500     510     520     530     540
ATGACTGGCTCCTGGACAACGACATAGCTTTGCTCTTGGCTCAAAATCCCATTAACCTTGAAGTGTCAACAGGATACCTATCTGCACTTCAG
D W L L D N D I A L L L L K S P L N L S V N R I P I C T S E

550     560     570     580     590     600     610     620     630
AAATCTCTGACATACAGGCACTGGAGGAACCTGCTGGGTGACAGGATGGGGCATTACTAATACTAGTGAAGAAAGGAGTCCAACCCACAAATTC
I S D I Q A W R N C W V T G W G I T N T S E K G V Q P T I L

640     650     660     670     680     690     700     710     720
TGCAGGCACTGAAAGTGGATCTGTACAGATGGGATTGGTGTGGCTATATTTGTCTCTATTAAACCAAGAAATATGCTGTGTGCTGGGACTC
Q A V K V D L Y R W D W C G Y I L S L L T K N M L C A G T Q

730     740     750     760     770     780     790     800     810
AAGATCCTGGGAAAGGATGCTGCTGCAAGGGGACAGTGGAGGAGCTCTGTTTGCACAAAAAGAGAAACACAGCCATTTGGTACAGGTTGG
D P G K D A C Q G D S G G A L V C N K K R N T A I W Y Q V G

820     830     840     850     860     870     880     890     900
GCATTGTGAGCTGGGGCATGGGCTGTGGCAAGGAATCTGCCAGGAGTATACACCAAGGTGTCACTATGTGAGGTGGATCAGCAAGC
I V S W G M G C G K K N L P G V Y T K V S H Y V R W I S K Q

910     920     930     940     950     960     970     980     990
AGACAGCGAAGGCGGGGAGGCTTATATGTATGAGCAGAACTCTGCGTGGCCTTTGGTGGCTCTTGGCCGGGCTATCTTGTTCCTATATT
T A K A G R P Y M Y E Q N S A C P L V L S C R A I L F L Y F

1000    1010    1020    1030    1040
TTGTAATGTTTCTTCTAACCTGATGATTAACGAGGACTGCC
V M F L L T *

```

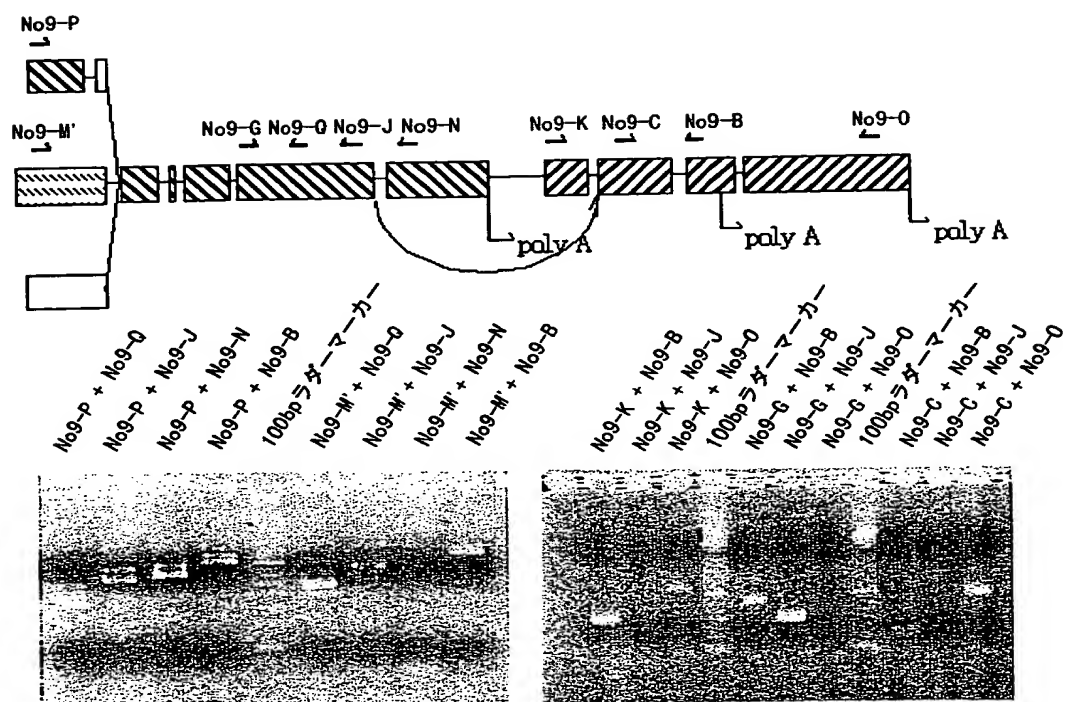
【図 2】



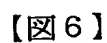
【圖 3】

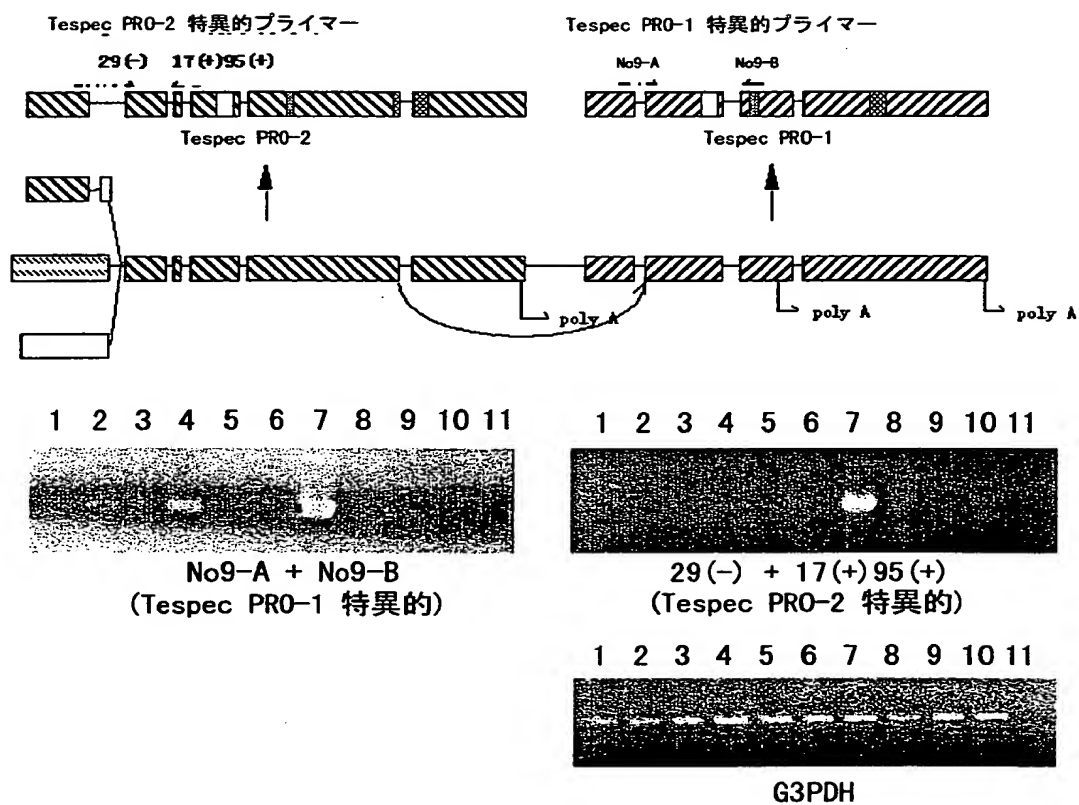
Tespec PR0-1 pep	MKRWKDRRTG	LLLPLVLLLF	GACSSLAWVC	GRRMSSRSQQ	LNNASAIVEG	KPASAIVGKK	60		
Tespec PR0-2 pep	M—MLP	LLIALLMASK	GQAKDQQ—	ESVLCGHRPA	FPNSSWL—	PLRELLEVO	47		
h. prostasin	MAQKGVLGPG	QLGAVAILLY	LGLLRSG—T	GAEGAEAPCG	V—APQA—	RITGGSSAV	52		
m. acrosin prec	MVEM—	LPTVAVLV—	LAVSVVA—K	DNTTCDGPCG	LRFRQNSQAG	TRIVSGQSAQ	50		
m. trypsin prec	MS—	—ALLI—	LALVGAA—V	AFPVDDDD—	—	KIVGGYTCT	31		
	*	..	.	.	.	.			
Tespec PR0-1 pep	PANILEFPWH	VGIMNHGS—	—HLCGGS	ILNEWVV	LSA SHCFDQ—	—LNNSKL	106		
Tespec PR0-2 pep	HG—EFPWQ	VSIQMLGK—	—HLCGGS	IIHRWWV	LTA AHCFPR—	TLLELVAVNV	94		
h. prostasin	AG—QWPWQ	VSI—TYEG	—VHVCSS	LVSEQWV	LSA AHCFPSEHHK	EAYEVKLGAA	103		
m. acrosin prec	LG—AWPWH	VSLQIFTSHN	SRRYHACGGS	LLNSHWV	LTA AHCFDNKKKV	YDWRLVFGAQ	107		
m. trypsin prec	ES—SVPYQ	VSL—NAG—	—YHFCGGS	LINDQWV	VSA AHCFKYRIQ—	VRLGEH	76		
	.	*	..	*	***	..	***		
Tespec PR0-1 pep	EIIHGTEELS	TKGIKYQKVD	KLFLHPKFDD	WLLDN	DIAL	LLKSPLNLSV	NRIPICTSE—	165	
Tespec PR0-2 pep	TVVMGIKTF	DTNLERKQVQ	KIIAHRDYK	PDLDS	DLCLL	LLATPIQFNK	DKMPICLPQ—	153	
h. prostasin	QLD—SY	SEDAKVSTLK	DIIPHPSYLQ	EGSQG	DIAL	QLSRPITFSR	YIRPICLPAA	158	
m. acrosin prec	EIEYGRNKP	KEPQQERYVQ	KIVIHEKYNV	VTEGN	DIAL	KITPPVTGCG	FIGPCCLPHF	167	
m. trypsin prec	NIN—VL	EGNEQFVDSA	KIIRHPNYS	WTLDN	DIMLI	KLASPVTLNA	RVASVPLP—	129	
	..		..	*	..	..	..		
Tespec PR0-1 pep	ISDIQAWRN—	CWVTGWGITN	TSEKGVQPTI	—LQAVKVDLY	RWDWCG—Y	ILSL—	214		
Tespec PR0-2 pep	REN—SWDR	CWMSEWAYTH	GHGSAKGSNM	HLKKLRVQI	SWRTCA—K	RVTQ—	201		
h. prostasin	NASFPNGLH—	CTVTGWGHVA	PSVSLTPKP	—LQGLEVPLI	SRETCNCLYN	IDAKPEEPHF	216		
m. acrosin prec	KAGPPQIPHT	CYVTGWGYIK	EKAPRPS—V	—LMEARVDLI	DLDLCNSTQW	YNGR—	219		
m. trypsin prec	SSCAPAGTQ—	CLISGWGNTL	SN—GVNNPDL	—LQCVDAVPL	POADCEA—S	YPGD—	178		
	.	.	*	..	*	.	.		
Tespec PR0-1 pep	LTKNMLCAGT	QDPGK	DACGG	DSGGALV	CNK	KRNTAIWYQV	GIVSWGMC	KKNLPGVYTK	274
Tespec PR0-2 pep	LSRNMLCAWK	EVGTN	GKCGG	DSGAPMV	CA—	NWETRRLFQV	GVFSWGITS	SRGRPGIFVS	260
h. prostasin	VQEDMVCAGY	VEGGK	DACGG	DSGGPLS	CPV	E—G—LWYLT	GIVSWGDCG	ARNRPGVYTL	273
m. acrosin prec	VTSTNVGAGY	PEGKI	DTCCG	DSGGPLM	ORD	NVDS—PFVVV	GITSWVGCA	RAKRPVGYTA	278
m. trypsin prec	ITNNMICVGF	LEGGK	DSCGG	DSGGPVV	CNG	ELQG—I—	—VSWGYGCA	QPDAPGVYTK	231
	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Tespec PR0-1 pep	VSHYVRWISK	QT—	—	AKAGRPYMYE	QNSACPLVLS	C—R—	—	—	308
Tespec PR0-2 pep	VAQFIPWILE	ET—	—	QREGRALALS	KASKSLLAGS	P—RYH—	—	—	296
h. prostasin	ASSYASWIS	KVT—ELQ	—	PRVVPQTQES	—QPDNLGGS	HLA—FSS	—	—	320
m. acrosin prec	TWDYLDWIAS	KIGPNALHLI	—	QPATPHPTT	RHPMVSFHP	SLRPPWYFQH	—	—	338
m. trypsin prec	VCNYVDWIGN	TI—	—	—	—	—	—	—	243
	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Tespec PR0-1 pep	—AIL—	—	—	FLYF—	—	—	—	—	321
Tespec PR0-2 pep	—PIL—	—	—	LSMG—	—	—	—	—	312
h. prostasin	LRPIL—	—	—	FLPL—	—	—	—	—	336
m. acrosin prec	LRPLLHRPSS	TQTSSSLMPL	—	LSPPTPAQPA	SFTIATQHMR	HRTTLSFARR	—	—	398
m. trypsin prec	—	—	—	—	—	—	—	—	243
Tespec PR0-1 pep	—	—	—	—	—	—	—	—	321
Tespec PR0-2 pep	—	—	—	—	—	—	—	—	319
h. prostasin	—	—	—	—	—	—	—	—	343
m. acrosin prec	RTYPMKHPSQ	YSGPRNYHYR	—	FSTFEPLSNK	—	PSEPLHLS	—	—	436
m. trypsin prec	—	—	—	—	—	—	—	—	246

【図 4】

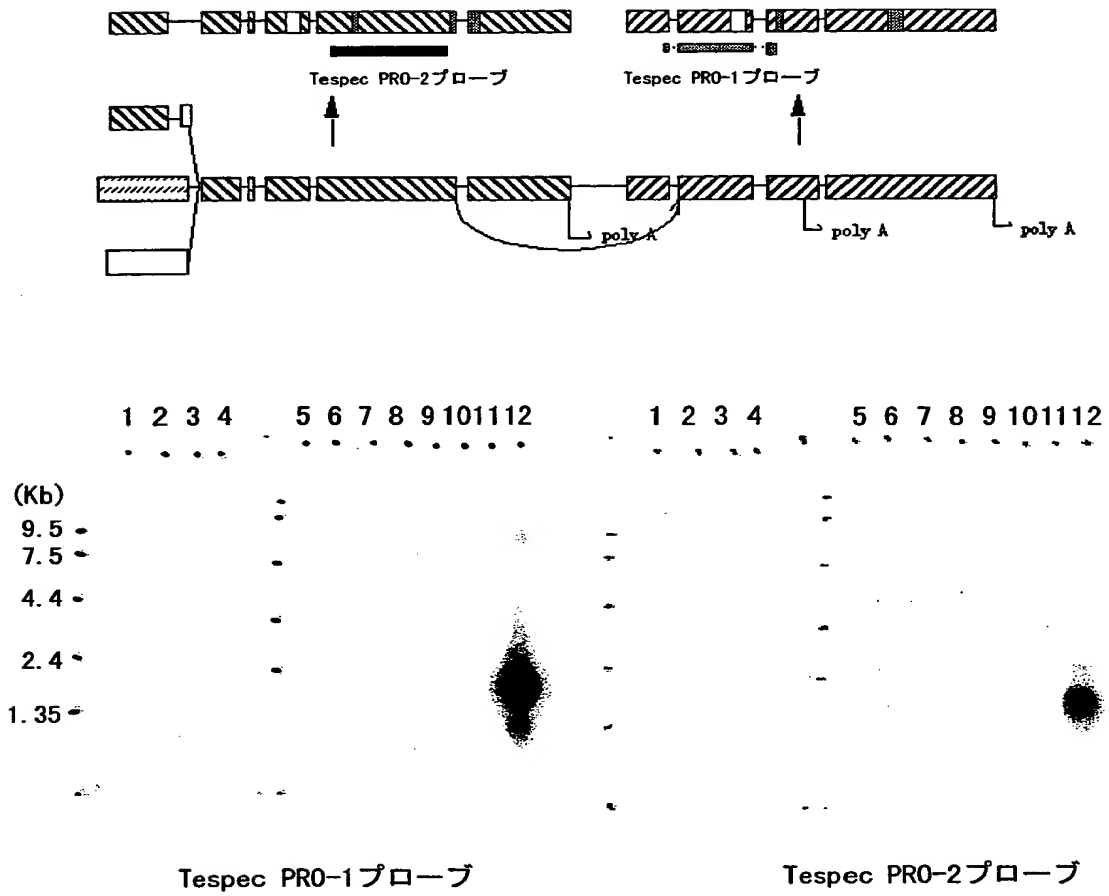


【図 5】

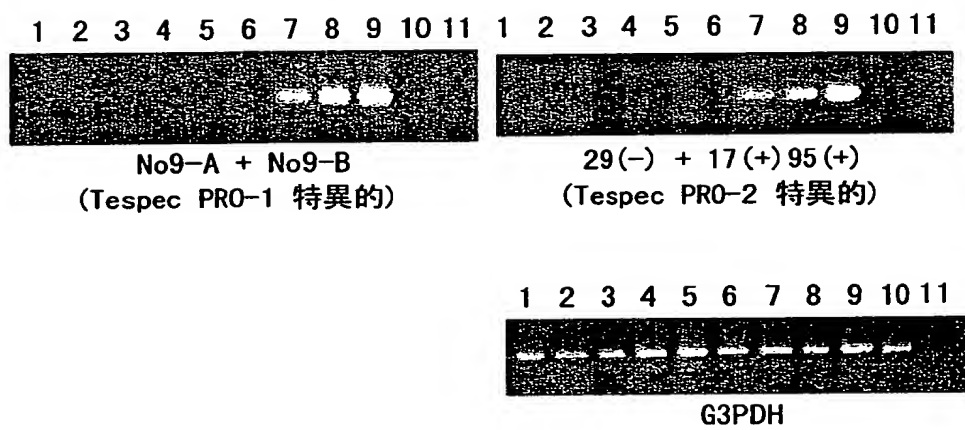




【図 7】



【図 8】



【図 9】

10 20 30 40 50 60 70 80 90  
 CTGTGGCTGGCATGTTGTCAAGCTCTGGCTGGAGGCAAAAGTTTGGCAATTTTGGACTGGAAATTGACAAGAGATGTTCCAGCTTCTAATT  
 M F Q L L I  
 100 110 120 130 140 150 160 170 180  
 CCCCTGCTTTTGGCACTCAAGGGACATGCCCAAGGACAATCCAGAAAACGTACAATGTGGCCACAGGCTGCTTTTCCAAACTCGTCATGG  
 P L L L A L K G H A Q D N P E N V Q C G H R P A F P N S S W  
 190 200 210 220 230 240 250 260 270  
 TTACCATTTTCATGAACGGCTTCAAGTCCAGAATGGTGAATGCCCTGGCAAGTGAATATCCAGATGTCACGGAAACACCTCTGTGGAGGG  
 L P F H E R L Q V Q N G E C P W Q V S I Q M S R K H L C G G  
 280 290 300 310 320 330 340 350 360  
 TCAATCTTACATTGGTGGTGGGTTCTGACAGCCGACACTGCTTCCGAAGAACCCTATTAGACATGGCCGTGGTAAATGTCAGTGTGGT  
 S I L H W W W V L T A A H C F R R T L L D M A V V N V T V V  
 370 380 390 400 410 420 430 440 450  
 ATGGGAACGAGAACATTGAGCAATCCACTCGGAGAGAAAGCAAGTGCAGAGGTCATTATTCACAAAGATTACAAACCGCCCAAGCTC  
 M G T R T F S N I H S E R K Q V Q K V I I H K D Y K P P Q L  
 460 470 480 490 500 510 520 530 540  
 GACAGTGAACCTCTCTCTGCTTCTACTTGCACACCAAGTGAATTCAGCAATTTCAAAATGCCTGTCTGCTGCAAGGAGGAGAGAGACC  
 D S D L S L L L L A T P V Q F S N F K M P V C L Q E E E R T  
 550 560 570 580 590 600 610 620 630  
 TGGGACTGGTGTGGATGGCAGAGTGGGTAACGACCAATGGGTATGACCAATATGATGACTTAAACATGCACCTGGAAAAAGCTGAGAGTG  
 W D W C W M A Q W V T T N G Y D Q Y D D L N M H L E K L R V  
 640 650 660 670 680 690 700 710 720  
 GTGCAGATTAGCCGAAAGAAATGTGCCAAGAGGGTAACCAAGCTGTCCAGGAACATGATTTGTGCTTCAACGAACCAAGGACCAATGGT  
 V Q I S R K E C A K R V N Q L S R N M I C A S N E P G T N G  
 730 740 750 760 770 780 790 800 810  
 ATCTTCAAGGGAGACAGTGGGGCACCTCTGGTTTGTCTATTATGGAACCCAGAGACTCTTCCAAGTGGGTGTCTTCAAGTGGGGGCATA  
 I F K G D S G A P L V C A I Y G T Q R L F Q V G V F S G G I  
 820 830 840 850 860 870 880 890 900  
 AGATCTGGCTCCAGGGGGAGACCTGGTATGTTTGTGTCTGTGGCTCAATTTATTCATGAAGCCAGGAGGAGACAGAAAAGGAGGGGAAA  
 R S G S R G R P G M F V S V A Q F I P \*  
 910 920 930 940 950 960 970 980 990  
 GCCTACACCATAATCTCAGGATCCAGAGAAAGCCGAGAGCTCACTGGTGTGTCTCCTCAGTACCCCTTCTTGTAGGATTGGGGTCTC  
 1000 1010 1020 1030  
 AAATGCTGCTGGCCACCATGTTTACCGGTGAATAAACCTAACYRCW

【図 10】

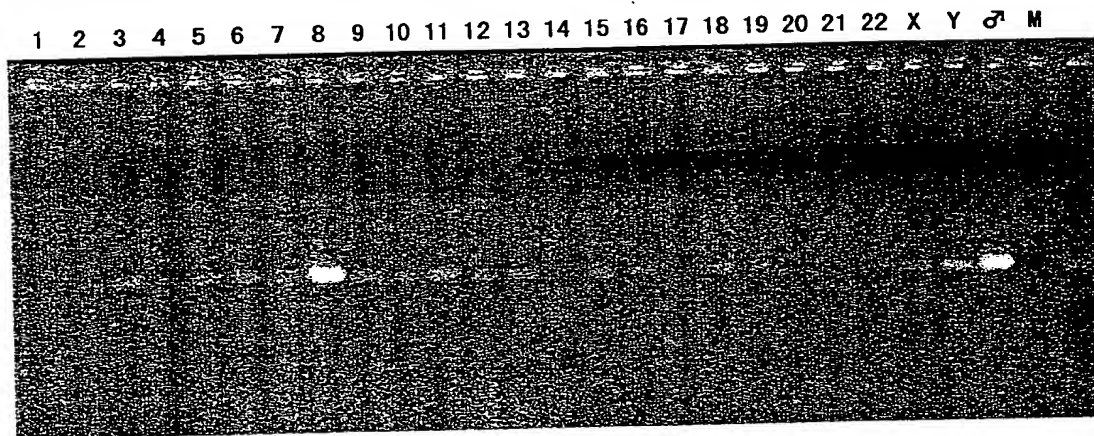


h. Tespec PRO-2	—CTGTCGCG TGGCATGCTG TCAAGCTCTGG CAGGAGGCA AGCTTTGGCA ATTCTTGACT	57
m.TespecPRO-2	CCCATGCGTN GGGTTC—TA TCAATGTGGG CAGGCAATCA AGC—CAGGCA CCATGCTACT	57
h. Tespec PRO-2	GGAAATGACA AGAAGATGTT CCACCTTCTA ATTCCCTGC TTTTGGGACT CAAGGGGACT	117
m.TespecPRO-2	GGAAATGACA AGAAGATGTT CCACCTTCTA ATTCCCTGC TCAATGGCTC CAAGGGGACT	116
h. Tespec PRO-2	GCCAGGACA ATCCAGAAAT GGTACATGTT GGCCACAGCC CTGGCTTTCC AAATCTGTCA	177
m.TespecPRO-2	GCTAGGACC ATCCAGAAAT AGTATGTTGT GGCCACAGCC CTGGCTTTCC AAATCTGTCA	176
h. Tespec PRO-2	TGCTTACCAT TTTAGGAGCG GCTTACAGTC CACATGGTG AGTCCCGCTG GCAAGTGAGT	237
m.TespecPRO-2	TGCTTACCAT TTTGGGAGCT GCTTACAGTC CACATGGTG AGTCCCGCTG GCAAGTGAGT	236
h. Tespec PRO-2	ATCCAGATGT CAGGGAACA CCTGTGGA GGCTCATCTT TTTCTTGGTG GTGGGTTCCT	297
m.TespecPRO-2	ATCCAGATGC TTGGAACA CCTGTGGA GGCTCATCTA TTTCTTGGTG GTGGGTTCCT	296
h. Tespec PRO-2	ACAGTGCAC ACTGCTTCCG AAGAACCTTA TTAGCATGG CCGTGGTAA TGTCACGTG	357
m.TespecPRO-2	ACAGTGCAC ACTGCTTCCG AAGAACCTTA TTAGCATGG TTTCTGGTAA TGTCACGTG	356
h. Tespec PRO-2	GTCATGGGAA CCGGAGATTT CACGACATTC TACTCGAGA GAATCAAGT GCAGAGCTG	417
m.TespecPRO-2	GTCATGGGAA TCTAGATTTT CAGTACATTC TACTTGGAGA GAATCAAGT GCAGAGCTG	416
h. Tespec PRO-2	ATTATTCACA AAGATTCAA ACCGCGCTG CTGACACCG AACTCTCTCT GCTCTACTT	477
m.TespecPRO-2	ATTATTCACA AAGATTCAA ACCGCGCTG CTGACACCG AACTCTCTCT GCTCTACTT	476
h. Tespec PRO-2	GCCACACCG TCCATTTCG CATTTCAAA ATGCCATCTT GCTGTCAGA GAGGAGTGG	537
m.TespecPRO-2	GCCACACCA TCCATTTCG TATAGTCAA ATGCCATCTT GCTGTCAGA GAGGAGTAC	536
h. Tespec PRO-2	ACCTGGGAT GGTCTGGAT CCGCAGTGG CCAACACCA ATGGGATGA CCAATATGT	597
m.TespecPRO-2	TCTGGGAC GGTCTGGAT CCGCAGTGG CCAATATCT ATGGCCTG TTTGGCCTA	596
h. Tespec PRO-2	GCTTAACA TGCACTTCA AAGCTTACA GTGGTACGA TTAGCTGGTA AGATGTGCTC	657
m.TespecPRO-2	GCTTAACA TGCACTTCA AAGCTTACG GTGGTACGA TTAGCTGGTA GATGTGTGG	656
h. Tespec PRO-2	AAGAGGTAA ACCAGCTTC CAGGACATG ATTGTGCTT CGATCGATC AGGCACCAT	717
m.TespecPRO-2	AAGAGGTAA CACAGCTTC CAGGACATG ATTGTGCTT CGATCGATG GGCACCATC	716
h. Tespec PRO-2	GCTATTTCA AGGAGACAG GGGGCACTT CTTGTGTG CTTTATGAG AACCTAGAG	777
m.TespecPRO-2	GCTATTTCC AGGAGACAG GGGGCACTC ATGGTGTG CTTTATGAG GATCTAGAG	776
h. Tespec PRO-2	CCTTTCAG TGGGTGCTT CACTGGGC ATATGCTG GCTTCAGGG GACCTGCTT	837
m.TespecPRO-2	CCTTTCAG TGGGTGCTT CACTGGGC ATATGCTG GCTTCAGGG GACCTGCTC	836
h. Tespec PRO-2	ATTTTGTGT CTTGGCTCA ATTATTTCA TTATCTTGG AGGAGACCA AATGGAGGG	897
m.TespecPRO-2	ATTTTGTGT CTTGGCTCA ATTATTTCA TTATCTTGG AGGAGACCA AATGGAGGA	896
h. Tespec PRO-2	AAGGCTACA CCAATATTC AGATCTAGG AAGATCTAG AAGCTCTG CTTGCTGTC	957
m.TespecPRO-2	CTAGGCTTG CCA—CTCAA AGC—CTCA TTAAGT— —TCTTGGCTG CC—ATCTCTC	948
h. Tespec PRO-2	CTATGATCC GCTTTGCTA CCAATGGCT CTCAAATCT GCTGGCTCC ATCTTATCC	1017
m.TespecPRO-2	GCTTGTGCT GCTTTGCTA CCAATGGCT CTCAAATCT GCTGGCTCC ATCTTATCC	1008
h. Tespec PRO-2	GCTATATC TATCTT	1035
m.TespecPRO-2	ATGATATC TATCTTCTAA GCTCTG	1034

【図 11】

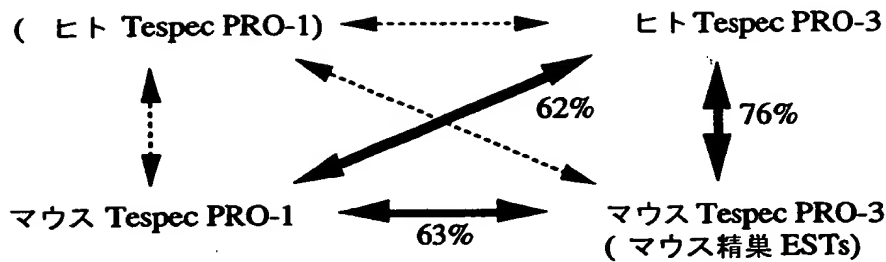
h. Tespec PRO-2 pep	MFQLLIPLLL AL---KGHA QDNPENVOCG HRPAPNSSW LPFHERLOVQ NGCEPWQVSI	56
m. Tespec PRO-2 pep	M---MLPLLI ALLMASKGQA KDOQESVLCG HRPAPNSSW LPLRELLEVO HGEFPWQVSI	57
	* ** * * * * *	
h. Tespec PRO-2 pep	QMSRKHLGG SILHWWVLT AAHC FRTLL DMAVNVTVV MGTRTFSTNH SERKQVQKVI	116
m. Tespec PRO-2 pep	QMLGKHLGG SIIHRWWVLT AAHC FRTLL ELVAVNVTVV MGIKTFSDTN LERKQVQKII	117
	** ** * * * * *	
h. Tespec PRO-2 pep	IHKDYKPPQL DSDLSLLLL TPVQFSNFKM PVCLQEEERT WDWCHMAQWV TTNGYDQYDD	176
m. Tespec PRO-2 pep	AHRDYKPPDL DSDLCLLLL TPIQFNKDKM PICLPQRENS WDRCHMSEWA YTHGHGSAKG	177
	* ** * * * * *	
h. Tespec PRO-2 pep	LNMIHLEKLRV VOISRKECAK RVNQLSRNMI CASNEPGTNG IFKGDSGAPL VCAIYGTQRL	236
m. Tespec PRO-2 pep	SNMHLKLRV VOISWRTCAK RVTQLSRNML CAWKEVGTNG KCGDSGAPM VCANWETRRL	237
	*** ** * * * *	
h. Tespec PRO-2 pep	FQVGVSFGGI RSGSRGRPGM FVSVAQFIP-	265
m. Tespec PRO-2 pep	FQVGVSFGI TSGSRGRPGI FVSVAQFIPW ILEETQREGR ALALSKASKS LLAGSPRYHP	297
	***** ** *****	
h. Tespec PRO-2 pep	-----	265
m. Tespec PRO-2 pep	ILLSMGSQIL LAAIFSDDKS NC	319

【図 1 2】



【図 1 3】

【图 14】



【図 15】

10 20 30 40 50 60 70 80 90  
GTGAGCCTGGCCTCCAACACACAGCACAGCCAGAGCCATGATCCTGCCCTCCATCCTGCTACTTGTGCCCCACACCCTGGAAAGCAAATGT  
M I L P S I L L L V A H T L E A N V

100 110 120 130 140 150 160 170 180  
TGAGTGTGGTGTGAGACCCCTGTATGATAGCAGAATTCAACTACTCCAGGATCATAGAAGGGCAGGAGGCTGAGCTGGGTGAGTTTCCATG  
E C G V R P L Y D S R I Q Y S R I I E G Q E A E L G E F P W

190 200 210 220 230 240 250 260 270  
GCAGGTGAGCATTACAGGAAAGTGACCACCATTTCTGCGGCGGCTCCATTCTCAGTGAGTGGTGGATCCTCACCCTGGCCCACTGCTTCTA  
Q V S I Q E S D H H F C G G S I L S E W W I L T V A H C F Y

280 290 300 310 320 330 340 350 360  
TGCTCAGGAGCTTTCCCAACAGATCTCAGAGTCAGAGTGGGAACCAATGACTTAACTACTTCACCCGTGGAACTAGAGGTCACCACCAT  
A Q E L S P T D L R V R V G T N D L T T S P V E L E V T T I

370 380 390 400 410 420 430 440 450  
AATCCGGCACAAAGGCTTTAAACGGCTGAACATGGACAACGACATTGCCTTGTGCTGCTAGCCAAGCCCTTGGCGTTCAATGAGCTGAC  
I R H K G F K R L N M D N D I A L L L L A K P L A F N E L T

460 470 480 490 500 510 520 530 540  
GGTGGCCATCTGCCTTCCTCTCTG6CCC6CCCCTCCCA6CTGGCAGCAATGCTGGGTGGCAGGATGGGGCGTAACCAACTCAACTGACAA  
V P I C L P L W P A P P S W H E C W V A G W G V T N S T D K

550 560 570 580 590 600 610 620 630  
GGAATCTATGTCAACGGATCTGATGAAGGTGCCCATGCGTATCATAGAGTGGGAGGAATGCTTACAGATGTTTCCAGCCTCACCACAAA  
E S M S T D L M K V P M R I I E W E E C L Q M F P S L T T N

640 650 660 670 680 690 700 710 720  
CATGCTGTGTGCCTCATATGGTAATGAGAGCTACGATGCTTGCCAGGGTGACAGTGGGGGACC6CTTGTCTGCACCACAGATCCTGGCAG  
M L C A S Y G N E S Y D A C Q G D S G G P L V C T T D P G S

730 740 750 760 770 780 790 800 810  
TAGGTGGTACCA6GTGGG6CATCATAGCTG6GG6CAAG6CTGTG6AAAAAAGGCTTCCCA6GGATATATACTGTATTGG6CAAAGTATAC  
R W Y Q V G I I S W G K S C G K K G F P G I Y T V L A K Y T

820 830 840 850 860 870 880 890 900  
CCTGTGGATTGAGAAAATAGCCAGACAGAGGGGAAGCCCTG6ATTTTAGAGGTCAGAGCTCCTCTAACAAGAAGAAAAACAGACAGAA  
L W I E K I A Q T E G K P L D F R G Q S S S N K K K N R Q N

910 920 930 940 950 960 970 980 990  
CAATCAGCTCTCCAAATCCCCAGCCCTGAAGTGC6CCCAAG6CTG6GCTCCTGCCCTGTCTGCTGCTCTTTGCACTGCTTAGAGCCTTGTG  
N Q L S K S P A L N C P Q S W L L P C L L S F A L L R A L S

1000 1010 1020 1030  
CAACTGGAAATAAAACAATGCAGTCTCTGATCCACCCT  
N W K

【图 16】

m. Tespec PRO-3	CTCAGCC TTG--CCCTCCA A--CNCACAG CACAGCC AG AGCCATGATC CTGCTCTCA	53
h. Tespec PRO-3	G--GCCTCT GTCACTCCG GGC--CACAG CACAGCC AG AGCCATGATC CTGCTCTCA	56
m. Tespec PRO-3	TCCTGCTACT TCTTCCCA--CAC-----CTT-----GG	80
h. Tespec PRO-3	TGTTGCTACT CTTGTCCTTG GTTACGGGAA CTCAGCTCGG TCCACGGACT CTTCTCCAG	116
m. Tespec PRO-3	AAGC--AANT G--T-----	90
h. Tespec PRO-3	AGGTTGCAAT GGTATCCTA GGCAGGGCTA GGGAGGCCA CCGCCCTCAG CCCCCTCATC	176
m. Tespec PRO-3	-----TGAG TGTGGTGTCA GACCCCTCTA TGATAGGAGA AATCAATACT	134
h. Tespec PRO-3	CCCCCAGCCC AGTCACTGAA TGTGGTGTCA GATCTATTTT CGAGGGGAGA AATCGGTATT	236
m. Tespec PRO-3	CCAGCATCAT AGAAGGGCAG GAGGCTGAGC TGGGTGAGTT TCCGTGGCAG GTGAGATTCT	194
h. Tespec PRO-3	CCAGCATCAT AGGAGGGATG GAGGCTGAGC TGGGTGAGTT TCCGTGGCAG GTGAGATTCT	296
m. Tespec PRO-3	AGGAAAGTGA CCACTTTTC TGCGGCGGCT CCATTCTCAG TGAGTGGTGG ATTCTCACCTG	254
h. Tespec PRO-3	AGGAAAGTGA CCACTTTTC TGCGGCGGCT CCATTCTCAG CAAGTGGTGG ATTCTCACCTG	356
m. Tespec PRO-3	TGGGCACTG CTTTATCTCT GAGGAGCTTT CCCCACAGA TCTCAGGTC AGACTGGGAA	314
h. Tespec PRO-3	GGGTCACCTG CTTTATCTCT GAGGAGCTTT TCCAGGAGA TCTCAGGTC GTGCTGGGAA	416
m. Tespec PRO-3	CCAACTGACTT AACTACTTCA CCGTGGAACTA--GAGGT CCCCACATA ATCTGGCACA	371
h. Tespec PRO-3	CCAACTGACTT AACTAGCCCA TCCNTGGAA TAAAGGAGGT CCCCACATC ATCTTCACA	476
m. Tespec PRO-3	AAGCTTTAA AGGCTGAAC ATGGACAAAG ACATTGCCTT GTTGTCTGTA GCGAAGCCCT	431
h. Tespec PRO-3	AAGCTTTAA GAGAGCCAAC ATGGACAAAG ACATTGCCTT GTTGTCTGTA GCTTGGCCA	536
m. Tespec PRO-3	TGGGCTTCA TGACTGACG GTGCCATCT GCCTTCTCT CTGCCCCGC CCTCCAGCT	491
h. Tespec PRO-3	TCAAGTTCA TGACTGACG GTGCCATCT GCCTTCTCT GAGCCCCGC CCTCCACAT	596
m. Tespec PRO-3	GGGACGAATG CTGGGTGGCA GGTGGGGG TAACCACTC AACTGACAAG GANTCTTGT	551
h. Tespec PRO-3	GGGACGAATG CTGGGTGGCA GGTGGGGG AGACCAATCT TCTGACAAA AACTCTTGA	656
m. Tespec PRO-3	CAACGGATCT GATGAAGGTG CCAATGCTGA TCATGAGATG GGAGGANTGC TTATAGATGT	611
h. Tespec PRO-3	CAACGGATCT GATGAAGGTG CCAATGCTGA TCATGAGATG GGAGGANTGT TTATAGATGT	716
m. Tespec PRO-3	TTCCAGCTT TACCAAAAAC ATGCTGTGTG CTTATATGG TAATGAGAGC TATGATGCTT	671
h. Tespec PRO-3	TTCCAAACT TACCAAAAAT ATGCTGTGTG CCGGATACAA TAATGAGAGC TATGATGCTT	776
m. Tespec PRO-3	GGAGGGTGA CAGTGGGGG CCGCTTGTCT GCACCCAGA TCCCTGGCAGT AGTGGTACC	731
h. Tespec PRO-3	GGAGGGTGA CAGTGGGGG CCGCTTGTCT GCACCCAGA TCCCTGGTGA AGTGGTACC	836
m. Tespec PRO-3	AGGTGGGCAT CATCAGCTGG GGAAGAGCT GTGGAAATAA AGGCTTCCCA GGGATATATA	791
h. Tespec PRO-3	AGGTGGGCAT CATCAGCTGG GGAAGAGCT GTGGAAATAA GAACAACCA GGGATATATA	896
m. Tespec PRO-3	CTGTAATTGC AAATATATAC CTGTGGATTG AGAAATAGC CCAGACAGAG GGGAGGCC	851
h. Tespec PRO-3	CTCGTTGGT GAATATATAC CTGTGGATTG AGAAATAGC CCAGCTAG-G AGGAGGCC	955
m. Tespec PRO-3	TGGATTITAG AGGTCA-GAG CTCTCTTAC AAGAAATAAA ACAGACAGAA CAATCAGTTC	910
h. Tespec PRO-3	TTCATGAGAG AGAAATGAG GACTCTCTTC AA--ATAAAA ACTATGCG TCCCACTCT	1013
m. Tespec PRO-3	TCCAANTCCC GAGCCTGAA CTGCCCCAA ACTGGCTCC TGGCTGTCT CTTGTCTTT	970
h. Tespec PRO-3	CGGCAATCCC GAGCCTGAG CTGCCCCAGA TCTGGCTCC GCTGTCTCT CTTGTCTTT	1072
m. Tespec PRO-3	GCACTGTTTA GAGCTTTTTC CACTGGAAA TAAAAAATG GAGTCTCTGA TTACCCCT	1028
h. Tespec PRO-3	GTGTTGTTTA GAGCTTTTTC GACTGTATA TAAAAAATG GAGCT--ATTCTTTC	1123

【図 17】

m. Tespec PRO-3	MILPSILLV -----A HTILHEAM-----	ECGRPLYD	27
h. Tespec PRO-3	MILPSMLL SLVTGTQLGP RTPLREAGVA ILGRARGAHR PQPRHPPSPV SECGRSIFE	60	
m. Tespec PRO-3	SRICYSRIIE GCEAEIGGEFP WQVSIQESDH HFCGGSI LSE WWILTMAHCF YACELSPITUL	87	
h. Tespec PRO-3	QTHYSRIITG GCEAEVGEFP WQVSIQARSE HFCGGSTLNK WWILTMAHC YSEELPTEL	120	
m. Tespec PRO-3	RMVGTNDLT TSPVEL-EVT TIIPHKCFKR LNMNDIAL L LLAAPLAFNE LVPICLP L W	146	
h. Tespec PRO-3	SMVLTNDLT SPSMETKEVA SIILHIDEKR LNMNDIAL L LLAAPLKLDD LVPICLP L Q	180	
m. Tespec PRO-3	PAAPSINHECW VAGWQMTNST DKESMSTDL M KMPMTILEWE ECLMFPELT INMLCASYEN	206	
h. Tespec PRO-3	PAAPSINHECW VAGWQMTNAA DKESMSTDL M KMPMTIMOWE ECLMFPELT INMLCASYEN	240	
m. Tespec PRO-3	ESYDAGGDS GGPLVCTIDP GSFMYQVGII SWGKSCGKKG HPGIYTLAK YILWIEKLAQ	266	
h. Tespec PRO-3	ESYDAGGDS GGPLVCTIDP GEFMYQVGII SWGKSCGKKN TPGIYTLVN YILWIEKLAQ	300	
m. Tespec PRO-3	TEGMLDFRG QSSSNKKNR QNNOLSKSPA LNCPD SWLLP CLLSFALLRA LSNWK	321	
h. Tespec PRO-3	LGGHFN-AE KRRTSVKPK MGSPVSGVFE PGSPD SWLLP CLLSHMLFRA ILY--	352	

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ、それらをコードする遺伝子、およびそれらの製造方法、並びにそれらの用途の提供を課題とする。

【解決手段】 成体マウス精巣に特異的に発現する2つの新規トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ(「Tespec PRO-1」及び「Tespec PRO-2」)、ならびにマウス由来の新規トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ「Tespec PRO-3」を単離した。さらにヒト由来の2つの新規トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ(「Tespec PRO-2」及び「Tespec PRO-3」)を単離した。これらのタンパク質は、精子の分化・熟成または精子の機能(受精)に関与していることが示唆され、新しい不妊症の治療薬や不妊症診断薬の開発、あるいは新しい避妊薬の開発に有用である。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 596102791  
【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2  
【氏名又は名称】 株式会社中外分子医学研究所

【代理人】

申請人  
【識別番号】 100102978  
【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階  
清水国際特許事務所  
【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774  
【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階  
清水国際特許事務所  
【氏名又は名称】 橋本 一憲



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[596102791]

1. 変更年月日 1996年 7月15日

[変更理由] 新規登録

住 所 茨城県新治郡新治村永井153番地2

氏 名 株式会社中外分子医学研究所

